

Entwicklung und Funktionsprüfung eines oxygenierenden Hohlfaserreaktors zur Kultivierung von Leberzellen

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Inka Jasmund

aus Hamburg

1. Referent: Prof. W.-D. Deckwer

2. Referent: Prof. A. Bader

eingereicht am: 14.10.2002

mündliche Prüfung (Disputation) am: 21.01.2003

(2003)

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Jasmund, I.; Langsch, A.; Simmoteit, R.; Bader, A. Cultivation of Primary Porcine Hepatocytes in an OXY-HFB for Use as a Bioartificial Liver Device. *Biotechnol Prog* **2002**, *18*, 839-46.

Tagungsbeiträge

Jasmund I., Bader A. Biochemical stability of porcine liver cells in an oxygenator. Vortrag: ITEM 2000, Innsbruck, 18.-20. Mai 2000.

Jasmund I., Schmidt-Richter I., Simmoteit R., Bader A. Oxygenation hollow fiber bioreactor for the cultivation of porcine liver cells. *Int J Artif Organs*: 23, 535. Vortrag: ESAO Congress, Lausanne, 31. August - 2. September 2000.

Jasmund I., Schmidt-Richter I., Simmoteit R., Bader A. Oxygenierender Hohlfaserreaktor für die Kultivierung von Schweinehepatozyten. *Z Gastroenterol* 39, 107. Poster: GASL, Aachen, 26. Januar 2001.

Jasmund I., Simmoteit R., Bader A. An improved oxygenation hollow fiber bioreactor for the cultivation of liver cells. Veröffentlicht in „Animal Cell Technology: From Target to Market“, Kluwer Academic Publishers. Poster: ESACT, Tylösand, 11.-14. Juni 2001.

Jasmund I. Cultivation of liver cells in an improved hollow fiber oxygenator. Vortrag: ICCE, Aachen, 4.-6. Juli 2001.

Jasmund I., Simmoteit R., Bader A. An improved hollow fiber oxygenator as a bioartificial liver. *Int J Artif Organs*: 24, 567. Poster: ESAO, Gent, 22.-25. September 2001.

Jasmund I., Simmoteit R., Bader A. An improved hollow fiber oxygenator as a bioreactor for liver cells. Vortrag: UEGW, Amsterdam, 6.-10. Oktober 2001.

Jasmund I., Simmoteit R., Bader A. Long-term cultivations of liver cells in an oxygenating hollow fiber bioreactor. Poster: ETES 2001, Freiburg, 8. November 2001.

Jasmund I., Langsch A., Gaylor J.D., Simmoteit R., Bader A. Characterization of a novel oxygenating hollow fibre bioreactor. Vortrag: ESAO 2002, Wien, 28.-31. August 2002.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. Bader.

Herrn Prof. Dr. Bader danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit dort durchzuführen, insbesondere aber für seine zahlreichen Ideen und die Gelegenheit zum sehr selbständigen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Deckwer gilt mein Dank für die Betreuung und die konstruktive Korrektur dieser Arbeit.

Für viele inspirierende Gespräche, die Idee zu diesem Projekt und die Bereitstellung der Quadrox und Hohlfasermatten danke ich Herrn Dr. Simmoteit und der Firma Jostra.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Courtney von der Strathclyde University in Glasgow bedanken, der mich in seinem Institut herzlich aufgenommen hat. Ebenso bin ich Frau Dr. Grant, Herrn Dr. Gaylor und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die größtmögliche Unterstützung während dieser Zeit zu Dank verpflichtet.

Dank gebührt Herrn Prof. Galanski für seine Unterstützung und die Bereitstellung von Räumen, so dass die Arbeit trotz des Umzugs von Herrn Prof. Bader in Hannover weitergeführt werden konnte.

Für das Interesse an meiner Arbeit und viele fruchtbare Diskussionen danke ich Frau Angelika Langsch ebenso wie für diverse Probenahmen an Wochenenden oder Feiertagen.

Für die große Hilfsbereitschaft möchte ich mich weiterhin bei Frau Ingrid Schmidt-Richter bedanken, die viele HPLC-Analysen durchgeführt hat, und bei den Mitarbeitern der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, die mich während des ersten Teils der Arbeit in vielfältiger Weise unterstützt haben.

Ohne das Mitwirken zahlreicher weiterer Personen im Tier-OP, in den Forschungswerkstätten, der Glasbläserei und die Unterstützung der eigenen Arbeitsgruppe wäre die Arbeit mit Sicherheit nicht gelungen, so dass hier noch einmal allen ausdrücklich gedankt sei.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Überblick	1
1.2	Zielsetzung	3
2	Theoretischer Hintergrund	5
2.1	Die Leber	5
2.1.1	<i>In vivo</i>	5
2.1.2	<i>In vitro</i>	7
2.2	Biochemie der Leber	9
2.2.1	Primärmetabolismus	9
2.2.2	Biotransformation	11
2.2.3	Phase I-Metabolismus	11
2.2.4	Phase II-Metabolismus	13
2.3	Anwendungen	14
2.4	Kultivierung von Leberzellen	16
2.4.1	Historischer Überblick	16
2.4.2	Die Sandwichkonfiguration	16
2.4.3	Bioreaktoren	17
3	Material und Methoden	21
3.1	Arbeiten mit primären Hepatozyten	21
3.1.1	Isolierung	21
3.1.2	Kultivierung	23
3.2	Kultivierung von HepG2	23
3.3	Kultursysteme	24
3.3.1	Petrischale	24
3.3.2	Quadrox	26
3.3.3	Oxy-HFB	28
3.4	Analytik	35

3.4.1	Zellzahlbestimmung	35
3.4.2	Primärmetabolite	36
3.4.3	Biotransformation.....	42
4	Charakterisierung der Kultivierungssysteme	47
4.1	Aufbau der Bioreaktoren.....	47
4.1.1	Quadrox	47
4.1.2	Oxy-HFB	48
4.2	Verweilzeitverteilung	49
4.2.1	Theoretischer Hintergrund	49
4.2.2	Versuchsdurchführung	53
4.2.3	Ergebnisse	54
4.2.4	Diskussion	59
4.3	Mischzeit	62
4.3.1	Theoretischer Hintergrund	62
4.3.2	Versuchsdurchführung	62
4.3.3	Ergebnisse und Diskussion.....	63
4.4	Gasaustausch	64
4.4.1	Theoretischer Hintergrund	64
4.4.2	Versuchsdurchführung	65
4.4.3	Ergebnisse	67
4.4.4	Diskussion	70
4.5	Zusammenfassung.....	74
5	Ergebnisse	75
5.1	Kultivierung von primären Hepatozyten im Quadrox.....	75
5.1.1	Prozess.....	75
5.1.2	Primärstoffwechsel.....	75
5.1.3	Biotransformation.....	78
5.1.4	Zusammenfassung.....	80
5.2	Kultivierung von primären Hepatozyten im Oxy-HFB.....	80
5.2.1	Nachweis der Eignung als Leberzellreaktor und Einfluss der Mediummenge	80

5.2.2	Einfluss des Hohlfasermaterials	90
5.2.3	Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit	90
5.2.4	Einfluss der Zelldichte	92
5.3	Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB.....	93
5.3.1	Biochemie.....	93
5.3.2	Zusammenfassung.....	96
6	Diskussion	97
6.1	Optimierung des Kultivierungssystems	97
6.1.1	Vergleich des Oxy-HFB mit dem Quadrox.....	97
6.1.2	Variation der Kultivierungsbedingungen im Oxy-HFB.....	108
6.2	Expansion	112
6.3	Vergleich des Oxy-HFB mit verschiedenen Bioreaktorsystemen.....	114
7	Ausblick	119
8	Zusammenfassung.....	121
9	Literaturverzeichnis.....	123
10	Anhang	133
10.1	Abkürzungen	133
10.2	Symbole.....	135
10.3	Material	136

1 Einleitung

1.1 Überblick

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde gezeigt, dass Gewebe von Tieren außerhalb des Körpers am Leben erhalten werden kann (Harrison 1907). Seitdem ist die Entwicklung der Zellkultur eng mit medizinischen Fragestellungen verbunden.

Die erste kommerzielle Anwendung von tierischen Zellkulturen bestand in der Produktion von Viren, die auch heute noch im großen Maßstab als Impfstoffe eingesetzt werden. Weiterhin spielt die Produktion von Proteinen mit therapeutischem Nutzen, die von tierischen Zellen sekretiert werden, wie z.B. der Blutgerinnungsfaktor VIII, eine große Rolle. Nicht zuletzt ist in der Produktion von monoklonalen Antikörpern durch Hybridomzellen, die in der Diagnostik und Therapie eingesetzt werden, ein weiteres Anwendungsfeld der tierischen Zellkultur zu sehen (Primrose 1990).

Ein neues Einsatzgebiet stellen in vielfältigen medizinischen Gebieten die Zellen selbst dar, wie z.B. in der Gentherapie, bei Transplantationen oder als Überbrückungssystem für den Patienten. Dabei sind häufig Leberzellen die Ansatzpunkte der Therapie, was vor allem durch die zentrale Stellung der Leber im Organismus begründet ist.

Ein neuer, schnell wachsender Teil der Biotechnologie ist der Versuch, funktionelle lebende tierische Gewebe *ex vivo* aufzubauen. Das Nachahmen von verschiedenen Geweben erfordert komplexe Systeme, die die Entwicklung und Kultivierung gemischter Zellpopulationen unterstützen. In diesem als „tissue engineering“ bezeichneten Bereich stellt der Aufbau einer bioartifiziellen Leber sowohl aufgrund der hohen Komplexität der Aufgaben der Leber als auch in Bezug auf die signifikanten klinischen Indikationen eine besondere Herausforderung dar (Langer und Vacanti 1993).

Die Zellkultur hat mittlerweile ein so hohes Niveau erreicht, dass es in vielen Bereichen als realistisches Ziel erscheint, die *in vivo*-Verhältnisse so zu imitieren, dass normale Zellen unter Kulturbedingungen wachsen und sich teilen. Es ist möglich, Langzeitkulturen von Zellen anzulegen, die in vielerlei Hinsicht den *in vivo* gefundenen Zellen gleichen. Zellkulturen helfen, die Mechanismen und die Prinzipien des Zellzyklus zu analysieren und die auslösenden Faktoren für die Vermehrung von Tumorzellen und die Steuerung der Genexpression zu finden. Die Zellkultur stellt ein geeignetes System dar, um Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge zu studieren. Da die Leber das zentrale Stoffwechselorgan ist,

eignen sich Leberzellen besonders für pharmakologische Untersuchungen und die Produktion leberspezifischer Proteine wie Gerinnungsfaktoren und Serumproteine.

Verglichen mit anderen Säugerzellen gelten Hepatozyten als eine der am schwierigsten zu kultivierenden Zellart. Bisherige einfache Kultursysteme von frisch gewonnenen Leberzellen hatten einen raschen Funktionsverlust dieser Zellen zur Folge. Es gibt diverse Ansätze, die zu einer Verbesserung der Kultur führen (s. Kap. 2.4.1). Die beschriebenen Langzeitkultivierungen werden jedoch nur mit vergleichsweise geringen Zellzahlen auf flachen Kulturunterlagen durchgeführt.

Um die Zelldichte und damit die Effektivität der Zellkultur zu erhöhen und gleichzeitig die Funktionsleistung der Hepatozyten zu erhalten, wurden Kulturtechniken entwickelt, bei denen die Zellen an dreidimensionale Strukturen gebunden oder in Matrices eingeschlossen werden (s. Kap. 2.4.2 und 2.4.3). Diese Strategie entwickelte sich in jüngster Zeit zu einem System, welches als bioartifizielle Leber in der Praxis bereits zur Anwendung gelangte (Gerlach 1996, Flendrig et al 1997b).

Der klinischen Anwendung geht aber häufig keine weitreichende Untersuchung voraus, die auch die Leistungsfähigkeit des Systems nachweist. Bei vielen bioartifiziellen Lebern wird eine externe Oxygenierung eingesetzt (Hay et al 2001, Rozga et al 1993, Shatford et al 1992, Sussman et al 1992, Jauregui et al 1994, Naka et al 1999, Naruse et al 2001), bei der das Medium vor dem Reaktor oxygeniert wird und anschließend in den Reaktor gelangt. Dieses Prinzip der Oxygenierung führt zu einer starken Abhängigkeit der Sauerstoffversorgung der Zellen von der Mediumversorgung. Dadurch werden die Möglichkeiten zur Durchführung eines Scale-Ups, Erhöhung der Zelldichte (und damit des Sauerstoffverbrauchs) und Änderungen in der Prozessführung stark eingeschränkt.

Maßnahmen zur Immobilisierung der Zellen in Microcarriern (Hay et al 2001, Rozga et al 1993) oder in Collagengel (Jauregui et al 1994, Naka et al 1999) sind üblich, erhöhen aber die Diffusionswege für Sauerstoff und Substrate bzw. Metabolite und bedeuten einen größeren Versuchsaufwand. Andere Systeme verwenden dreidimensionale Polyester-Matrixstrukturen, welche die Zellen im Reaktor zurückhalten und deren Differenzierung fördern sollen (Flendrig et al 1997b, Naruse et al 2001). Wie bei den anderen Immobilisierungsmethoden sind längere Diffusionswege, besonders für Sauerstoff, die Folge.

In einigen Systemen werden die oben beschriebenen Probleme vermieden. Gerlach et al (1994a) entwickelten eine bioartifizielle Leber, die aus einem komplizierten Hohlfasersystem mit integrierter Oxygenierung besteht. Das Medium gelangt über Hohlfasern, die

dezentralisiert im Bioreaktorinneren enden, zu den Zellen und strömt durch Hohlfasern, die ebenso dezentralisiert im Reaktor anfangen, nach außen. Das System ermöglicht so geringe Diffusionsstrecken, kann aber mathematisch schlecht beschrieben werden und ist sehr kompliziert aufgebaut. Bisherige Kultivierungen wurden nur mit niedrigen Zelldichten durchgeführt (Gerlach et al 1994b).

Bader et al haben einen Flachmembranbioreaktor entwickelt (De Bartolo et al 2000, Langsch und Bader 2001), der die *in vivo*-Situation gut imitiert. Durch die Kultivierung der Leberzellen in der „zweidimensionalen“ Sandwichkonfiguration sind aber nur geringe Zelldichten möglich, so dass Kultivierungen hoher Zellzahlen nur mit großem Aufwand zu realisieren sind.

Zusammengefasst gibt es zur Zeit kein geometrisch definiertes und zugleich einfaches Bioreaktorsystem, das eine unabhängige Oxygenierung bietet, kurze Diffusionsstrecken ermöglicht und die Kultivierung differenzierter Leberzellen bei hohen Zelldichten erlaubt.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Kultursystem aufzubauen, das den hohen Anforderungen der Erhaltung und Expansion hepatischer Zellen bei hohen Zelldichten entspricht.

Das System des Flachmembranbioreaktors konnte für den Einsatz im pharmakologischen Screening seine Eignung beweisen und scheint im Vergleich zu anderen Bioreaktoren die hepatischen Eigenschaften gut zu erhalten. Für den Einsatz als bioartifizielle Leber oder die Produktion von beispielsweise Serumproteinen ist aber ein dreidimensionales System erforderlich, um hohe Zelldichten zu erhalten. Eine eventuell verminderte zellspezifische Leistung könnte dabei problemlos durch die Zellmasse ausgeglichen werden. Deshalb sollte in dieser Arbeit das vielversprechende Grundprinzip des Flachmembranbioreaktors, das oxygenierende Trägersystem, auf ein dreidimensionales System übertragen werden.

Viele der bereits vorhandenen Kultivierungssysteme beruhen auf der Hohlfasertechnologie, die aber bis auf wenige Ausnahmen nicht zur Oxygenierung der Zellen genutzt wird. Das Konzept des zu entwickelnden Bioreaktors sah den Einsatz von Oxygenierungsfasern vor. Die Zellen sollten auf und zwischen den Hohlfasern adhären und aggregieren, so dass auf eine Immobilisierung und die Zugabe von Matrices verzichtet werden kann. Durch geringe

Abstände zwischen den Hohlfasern und einen streng definierten Aufbau sollte eine optimale Versorgung der Zellen im extrakapillaren Raum mit Sauerstoff aus den Hohlfasern und Nährstoffen aus dem umgebenden Medium gewährleistet werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst gezeigt werden, ob die Kultivierung von Hepatozyten unter den beschriebenen Bedingungen möglich ist. Für erste Versuche konnte auf ein etabliertes System zur Oxygenierung von Blut, dem Oxygenator Quadrox der Firma Jostra, zurückgegriffen werden, der den gestellten Anforderungen nahe kam.

Nachdem dieses einfache „Kultivierungssystem“ seine Eignung bewiesen hatte, sollte die Oxygenatortechnologie des Quadrox an die speziellen Anforderungen der Zellkulturtechnik angepasst werden. Es wurde der oxygenierende Hohlfaserreaktor (Oxy-HFB) entwickelt, der die Vorteile eines Festbettreaktors (hohe Zelldichte, kontinuierlicher Mediendurchfluss) mit denen eines Oxygenators (optimale Sauerstoffversorgung) verbindet und dabei die metabolischen Funktionen der Zellen über längere Zeit auf hohem Niveau erhält.

Sowohl der Oxygenator Quadrox als auch der Oxy-HFB sollte hinsichtlich der Oxygenierung und der Fluidodynamik charakterisiert werden, um die Eignung als Bioreaktor zu prüfen und Schwachpunkte aufzudecken.

Nachdem die prinzipielle Eignung des Oxy-HFB gezeigt war, sollten verschiedene Prozessparameter wie das Mediumvolumen, die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums und die Zelldichte bei der Kultivierung von primären Leberzellen variiert werden, um Grenzen und Optima der Kultivierungsparameter aufzuzeigen.

Zuletzt sollte am Beispiel der Hepatoma-Zelllinie HepG2 gezeigt werden, dass das entwickelte System eine Expansion von Zellen ermöglicht und für Langzeitkultivierungen geeignet ist, ein Aspekt, der für Produktionssysteme von Interesse ist und, wenn die wissenschaftlichen Voraussetzungen geschaffen sind, Vorarbeiten für die Expansion primärer Zellen zum Einsatz als bioartifizielle Leber darstellt.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Die Leber

2.1.1 *In vivo*

Architektur:

Hepatozyten (parenchymale Zellen) sind *in vivo* als Monolayer in der extrazellulären Matrix des Disseschen Spaltraums eingebettet. Bei dem Disseschen Spaltraum handelt es sich um einen 0,5 – 2 µm breiten Raum zwischen den Endothelzellen der Sinusoide und den Leberzellen. Die Sinusoide mit einem mittleren Durchmesser von 5 - 7 µm sind erweiterte Gefäßräume innerhalb der Leber, die eine Mischung aus portalvenösem und arteriellem Blut leiten. Nährstoffe, Toxine und hepatozelluläre Sekretionsprodukte passieren zuerst die nicht-parenchymale Zellschicht und dann den Disseschen Spaltraum, bevor sie die Hepatozyten erreichen. Die durch den Stoffwechsel entstehende Gallenflüssigkeit wird in die Gallenkapillaren, einem intrazellulären Raum zwischen den Hepatozyten, abgegeben (Löffler und Petrides 1998).

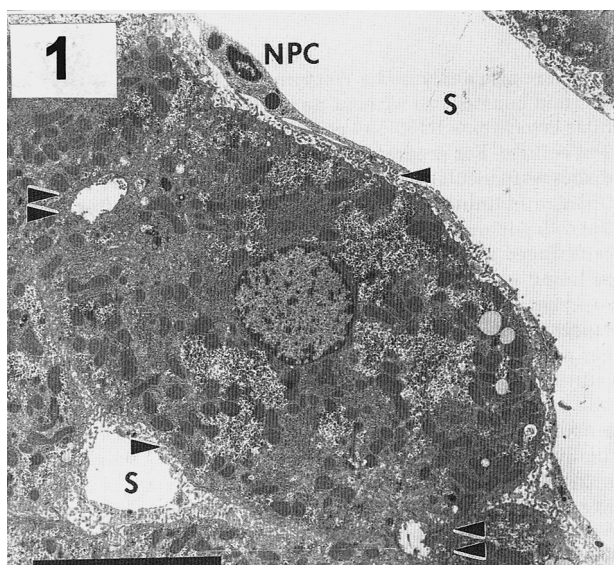


Abb. 2-1: Mikrographie normaler Rattenleber, polyedrische Hepatozyten innerhalb des Disseschen Spaltraumes (Pfeilspitzen), Sinusoide (S) und eine nicht-parenchymale Zelle (NPC) mit der typischen Form einer Endothelzelle. Auf jeder Seite des Hepatozyten befindet sich der Querschnitt einer Gallenkapillare. Balken: 5 µm (Bader 1996).

Die Leber ist kein rein hepatozelluläres Organ, sondern besitzt auch nicht-parenchymale Zellen (Abb. 2-1). So besteht die Gefäßwand aus Endothelzellen, die einerseits zu den Sinusoiden ausgerichtet und andererseits mit der darunter liegenden extrazellulären Matrix verankert sind. Kupfferzellen sind Makrophagen, die sich häufig oberhalb der Endothelzellen

befinden. Itozellen (Fettspeicherzellen) können ebenfalls im Disseschen Spaltraum gefunden werden, wobei diese Zellfortsätze zu den Hepatozyten aussenden. Pitzellen sind in der Leber verweilende Lymphozyten, die immer im Lumen der Sinusoide gefunden werden (Löffler und Petrides 1998, Bouwens und Wisse 1988, Bouwens et al 1992).

Aufgaben:

Die Leber erfüllt im Organismus vielfältige Aufgaben (s. Abb. 2-2, Kmiec 2001). Alle nicht-hepatischen Organe sind direkt auf die Leber angewiesen, da die Leber das zentrale Stoffwechselorgan ist.

Als Zentrum des Metabolismus sorgt sie für die Deckung des Energiebedarfs des Organismus. Sie regelt den Glukose- und Aminosäurehaushalt, indem sie diese nach Bedarf verbraucht, speichert oder wieder abgibt. Der Stickstoff im Organismus wird durch die Bildung von Harnstoff in der Leber und anschließende Ausscheidung über die Niere entsorgt. Fettsäuren werden aus Acetat-Einheiten aufgebaut. Daraus können dann Fette und Phospholipide gebildet werden, die in Form von Lipoproteinen ans Blut abgegeben werden. Umgekehrt kann die Leber dem Plasma auch Fettsäuren entnehmen. Für die Energieversorgung des Organismus ist die Fähigkeit der Leber wichtig, die Fettsäuren in Ketonkörper umzuwandeln und diese wieder auszuschütten (Koolman und Röhm 1998).

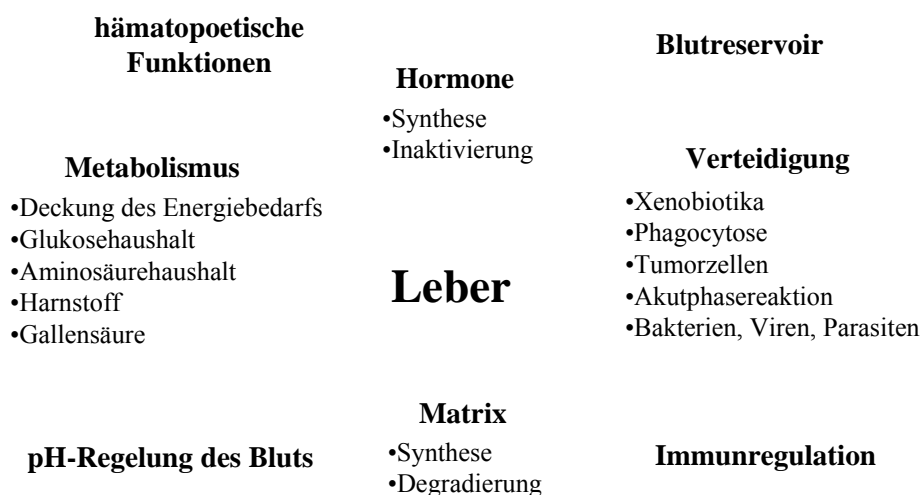


Abb. 2-2: Aufgaben der Leber.

Die Leber ist in der Lage, aus Acetat Cholesterin aufzubauen, das als Bestandteil von Plasma-Lipoproteinen anderen Organen zugeführt wird. Überschüssiges Cholesterin wird in der Leber in Gallensäuren umgewandelt oder mit der Galle ausgeschieden.

Steroidhormone und Bilirubin sowie Pharmaka, Ethanol und andere Xenobiotika werden von der Leber aufgenommen und durch Umwandlungsreaktionen inaktiviert und in stärker polare Metabolite übergeführt.

Auch in anderer Hinsicht dient die Leber der Verteidigung. In der Leber werden Bakterien, Viren, Parasiten und andere Schädlinge aufgenommen und zerstört. Tumorzellen können eliminiert werden und die Akutphasereaktion findet in der Leber statt.

Durch die Synthese und Degradierung von extrazellulären Matrixkomponenten dient die Leber der Bildung und dem Erhalt von Organstrukturen.

Weiterhin findet in der Leber die Kontrolle über das Hormonsystem statt. Diese beinhaltet die Inaktivierung und Eliminierung von Hormonen und Mediatoren, die Synthese und Freisetzung von (Pro)hormonen und die Synthese von Hormon-bindenden Proteinen.

Die Leber dient als Blutreservoir zur passiven und aktiven Blutspeicherung und ist an der pH-Regelung des Blutes beteiligt. Weiterhin erfüllt sie hämatopoetische Funktionen in fötalem und wahrscheinlich postnatalem Leben und hat immunregulatorische Aufgaben.

2.1.2 *In vitro*

Primäre Zellen:

Primäre Hepatozyten können aus tierischen oder humanen Lebern in einer aufwendigen Prozedur (s. Kap. 3.1.1) gewonnen werden. Solche Hepatozyten sind anfällig gegenüber Kontaminationen und nur für kurze Zeit im differenzierten Zustand zu halten. Es ist bis heute schwierig, primäre Hepatozyten *in vitro* zu expandieren. Die Vorteile homologer und human-spezifischer Funktionen sind jedoch so groß (Ekins et al 2000), dass intensiv nach den Bedingungen zur Expansion und Erhaltung vitaler, differenzierter humaner Hepatozytenkulturen geforscht wird (Dunn et al 1989, Riordan und Williams 1997, te Velde et al 1995).

Dabei wird verschiedenen Ansätzen nachgegangen. Primäre adulte Leberzellen weisen idealerweise das vollständige biochemische Spektrum auf, besitzen aber nur ein sehr geringes Proliferationspotential. Eine Verbesserung der biochemischen Stabilität (Cross und Bayliss 2000) und Kryokonservierbarkeit (Hengstler et al 2000) würde die Verfügbarkeit dieser Zellen entscheidend verbessern.

Ein anderer Ansatz besteht in der Verbesserung der Proliferationsmöglichkeiten primärer fötaler Leberzellen (Curran et al 1993, Hamamoto et al 1999). Fötale Zellen besitzen

einerseits ein deutlich größeres Proliferationspotential als adulte, weisen aber andererseits noch nicht das vollständige leberspezifische Spektrum adulter Hepatozyten auf (Ballard und Hanson 1967, Yeoh et al 1979). Neuere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass fötale Hepatozyten sich unter den geeigneten Kultivierungsbedingungen innerhalb weniger Kulturtage dem leberspezifischen Potential adulter Hepatozyten annähern (Schmelzer 2002).

Trotz intensiver Forschungen ist es bis heute noch nicht gelungen, Hepatozyten *in vitro* auf Wunsch proliferieren oder differenzieren zu lassen. Dabei demonstrieren diese Zellen *in vivo* in eindrucksvoller Weise ihre Regenerationsfähigkeit, wenn nach einer Hepatektomie 30 -35 % der Leber ausreichen, den Organismus am Leben zu erhalten, und die Leber innerhalb von 6 – 8 Tagen wieder ihre ursprüngliche Ausdehnung erreicht (Fausto 2000).

Deshalb bedeutet die Kultivierung primärer adulter Leberzellen bis heute lediglich den Erhalt der Zellen *in vitro* unter Beibehaltung möglichst vieler hepatischer Eigenschaften, ohne dass die Zellen proliferieren oder einmal verlorene differenzierte Eigenschaften wiedererlangen können.

Zelllinien:

Zelllinien sind im Vergleich zu primären Zellen in der Regel wesentlich einfacher zu handhaben: Sie lassen sich problemlos lagern und sind damit jederzeit verfügbar. Zudem kann man Zelllinien nahezu beliebig expandieren. Allerdings weisen Zelllinien im allgemeinen auch nur ein begrenztes Spektrum an hepatischen Eigenschaften auf.

Viele Zelllinien wurden aus humanen Leberkarzinomen entwickelt (Sussman et al 1992) wie beispielsweise die Leberzelllinie HepG2. Solche Zellen können effektiv eingesetzt werden, wenn die Funktion normaler Leberzellen gut bewahrt wurde. In der Praxis weisen diese Zellen aber ein hohes Potential an abnormalen genetischen Komponenten auf, die eine normale Proteinsynthese und Enzymaktivität beeinträchtigen (Shaw et al 1990). Beim Einsatz solcher Zelllinien zur Behandlung von Patienten können Probleme auftreten, wie der Verlust von leberspezifischen Funktionen und das mögliche Auftreten von Metastasen, die bis heute nicht zufriedenstellend diskutiert wurden (Nagamori et al 2000).

Stammzellen:

Ein ebenfalls vielversprechender Ansatz, differenzierte Hepatozyten in ausreichender Anzahl zu erhalten, liegt in der Erforschung und Nutzung embryonaler und Knochenmark-Stammzellen (Forbes et al 2002, Schwartz et al 2002). Zusätzlich besteht die Möglichkeit,

Progenitorzellen, die „Stammzellen der Leber“ zu nutzen (Theise et al 1999). Ein Nutzen dieser Quellen würde nicht nur speziesspezifische, sondern auch autologe Zellen verfügbar machen. Legt man das Proliferationspotential der Hepatozyten *in vivo* zugrunde, dürfte so auch der quantitative Bedarf gedeckt werden können. Es muss aber noch viel über den Mechanismus der Zelldifferenzierung und Regenerierung verstanden werden, bevor diese Quellen nutzbar gemacht werden können.

2.2 Biochemie der Leber

2.2.1 Primärmetabolismus

Glukose:

Glukose ist neben den Fettsäuren und Ketonkörpern der wichtigste Energielieferant des Organismus. Der Glukose-Spiegel im Blut wird durch eine präzise Regulation konstant gehalten. In der Leber wird ein großer Teil der Glukose zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Auch aus der Nahrung stammende Fruktose, Galaktose und Mannose wird von den Leberzellen aufgenommen und in Glukose-6-Phosphat überführt. Glukose-6-Phosphat ist in der Leber das Ausgangssubstrat für verschiedene Stoffwechselwege. Bei hohen Blutglukose-Konzentrationen wird Glukose-6-Phosphat in Form von Glykogen gespeichert. Bei Glukose-Mangel liefert die Leber dagegen Glukose, die entweder direkt aus Glukose-6-Phosphat oder aus der Wiederfreisetzung der gespeicherten Glukose via Glukoneogenese stammt. Über diesen Stoffwechselweg ist die Leber auch zu einer *de novo*-Synthese von Glukose aus Laktat und Aminosäuren in der Lage. Durch die Wirkung verschiedener regulierender Enzyme und Hormone kommt es somit, je nach den im Organismus herrschenden Verhältnissen, zu einer Verteilung des Glukoseflusses in verschiedene Stoffwechselwege. Daneben kommt es zur Bildung von Acetyl-CoA aus Glukose-6-Phosphat via Glykolyse und der Einspeisung in den Citratzyklus, wo das Acetyl-CoA unter CO₂-Bildung oxidiert wird. Der anschließende Elektronentransport und die oxidative Phosphorylierung erzeugen dabei Energie in Form von ATP. Normalerweise sind jedoch Fettsäuren das Hauptsubstrat der Leber (Löffler und Petrides 1998).

Aminosäuren:

Aminosäuren werden zum einen für die Proteinbiosynthese der Leber verwendet. Neben der Synthese von Serumproteinen wie Albumin werden in der Leber aus Aminosäuren auch Nukleotide (sowohl Pyrimidine als auch Purine) synthetisiert. Zum anderen werden Aminosäuren desaminiert und in den Citratzyklus eingespeist. Von hier können sie durch die Glukoneogenese in Glukose und Glykogen umgewandelt werden. Mit der Erzeugung von Acetyl-CoA via Citratzyklus können Aminosäuren zur Bildung von ATP verwendet werden. Der bei der Desaminierung freigesetzte Ammoniak kann von der Leber über den Harnstoffzyklus in Harnstoff umgewandelt und ausgeschieden werden (Löffler und Petrides 1998).

Harnstoff:

Beim hepatischen Abbau der Aminosäuren wird direkt oder indirekt Ammoniak freigesetzt. Der Abbau von Purinen und Pyrimidinen liefert ebenfalls Ammoniak, ein Zellgift, das durch die Bildung von Harnstoff ausgeschieden werden kann.

Harnstoff wird in einer zyklischen Reaktionsfolge, dem Harnstoff-Zyklus, in der Leber gebildet. Das bei der Desaminierung anfallende Ammoniak wird im Cytosol mit Citrullin zu Argininsuccinat (Schnittstelle zum Citratzyklus) umgesetzt, welches unter Fumaratabspaltung in Arginin umgewandelt wird. Anschließend erfolgt eine Hydrolyse in Harnstoff und Ornithin. Das Ornithin wird in den Mitochondrien recycelt. Dabei kommt es zur Bildung von Citrullin unter Carbamoylphosphatverbrauch, welches ebenfalls in den Mitochondrien aus Glutamat synthetisiert wird. Der Energieaufwand für die Biosynthese von Harnstoff ist hoch, da insgesamt vier energiereiche Bindungen für die Synthese eines Harnstoff-Moleküls gespalten werden (Löffler und Petrides 1998).

Albumin:

Ein wichtiger Parameter für die metabolische Kapazität von Leberzellen ist die Albuminsekretion, die *in vivo* im gesunden Organismus (Rothschild et al 1988) weitaus höher ist als bei Lebererkrankungen wie der Zirrhose oder Hepatitis (Annoni et al 1990). Albumin macht etwa 50 % aller Serumproteine aus und ist verantwortlich für die Osmoregulation und pH-Wert-Stabilität des Blutes und fungiert als Konjugations- und Transportprotein für Xeno- und Endobiotika.

Laktat:

Bei Sauerstoffmangel im Gewebe kann NADH_2 verstärkt den Wasserstoff auf Pyruvat übertragen und somit vermehrt Laktat bilden. Daher eignet sich dieser Parameter zur Beurteilung der Oxygenationsbedingungen. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass die Laktatbildung ebenfalls stark von der hormonellen Regelung anderer Stoffwechselvorgänge wie Glykolyse, Glukoneogenese oder Glutaminolyse abhängt (Zeng und Deckwer 1995, Neermann und Wagner 1996).

2.2.2 Biotransformation

Der Organismus nimmt mit der Nahrung oder durch den Kontakt mit der Umwelt über Haut und Lunge Fremdstoffe auf, die häufig vor allem in höheren Konzentrationen schädlich sind. Mittels Biotransformationen ist der Organismus in der Lage, die Fremdstoffe zu inaktivieren und auszuscheiden. Die Biotransformation läuft meistens in zwei Phasen vor allem in der Leber ab. Prinzipiell ist aber fast jedes Organ im Körper zu diesen Reaktionen fähig (besonders Niere, Magen-Darm-Trakt, Lunge, Blut, Gehirn, Plazenta, Haut).

2.2.3 Phase I-Metabolismus

Phase I-Reaktionen führen funktionelle Gruppen in unpolare Moleküle ein oder wandeln vorhandene funktionelle Gruppen um. In der Regel hat dies eine Erhöhung der Polarität und eine Verringerung der biologischen Aktivität oder Toxizität zur Folge. Einige Pharmaka und manche Karzinogene werden allerdings erst durch die Umwandlungsreaktion biologisch aktiv.

Häufig stellt die Phase I-Reaktion nur eine Vorbereitung auf die Phase II-Reaktion dar. Das heißt, in der Phase I-Reaktion wird eine chemisch reaktive funktionelle Gruppe, häufig eine OH-Gruppe, produziert oder enthüllt, an der die Phase II-Reaktion stattfinden kann (Gibson und Skett 2001). Wichtige Biotransformationsreaktionen der Phase I sind (Koolman und Röhm 1998):

- Hydrolytische Spaltungen: Ester- und Peptid-Spaltungen,
- Oxidationsreaktionen: Hydroxylierungen, Epoxid-Bildung, Sulfoxid-Bildung, Dealkylierungen, Desaminierungen,

- Reduktionsreaktionen: Reduktion von Carbonyl-, Azo- oder Nitro-Verbindungen, Dehalogenierung,
- Methylierung und
- Desulfurierung.

Die Reaktionen laufen in den Hepatozyten am glatten endoplasmatischen Retikulum ab. Die Oxidationsreaktionen werden dabei von Enzymen des Cytochrom P450-Systems (CYP450) katalysiert.

In Abb. 2-3 ist der Abbau von Diazepam dargestellt. Dabei sind zwei alternative Abbauewege möglich: Entweder wird Diazepam erst demethyliert und anschließend hydroxyliert oder umgekehrt (Zomorodi 1995). Dabei entsteht entweder Nordazepam oder Temazepam als Zwischenprodukt. In die Demethylierung sind die CYPs 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 3A4 und 3A5 involviert, während die Hydroxylierung von den CYPs 3A4, 3A5 und 2C19 katalysiert wird.

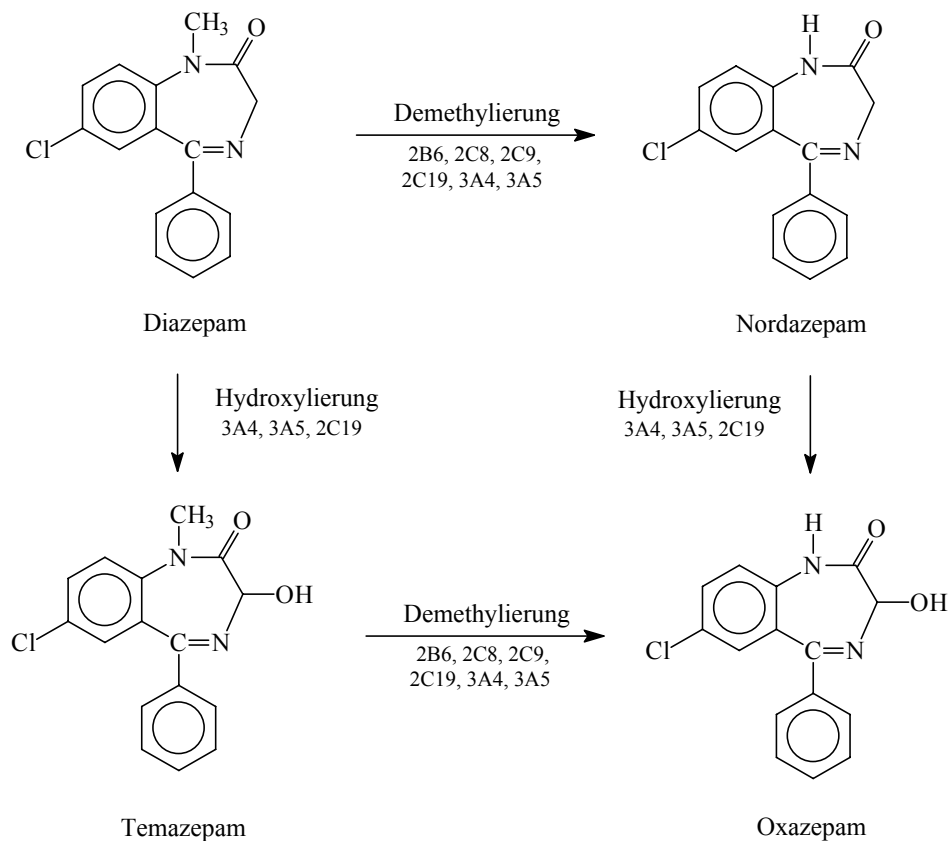
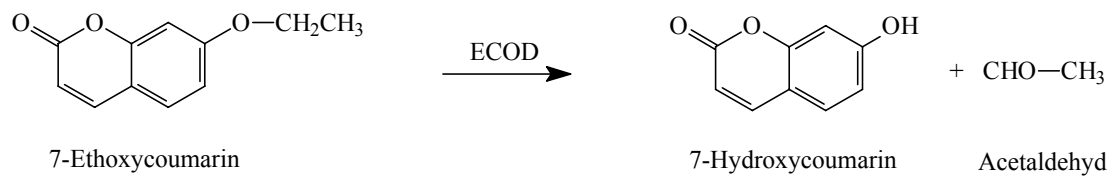


Abb. 2-3: Abbauewege des Diazepams. Das Diazepam wird entweder über das Zwischenprodukt Nordazepam oder Temazepam zu dem Endprodukt Oxazepam abgebaut. Je nach Reaktionstyp (Demethylierung oder Hydroxylierung) sind unterschiedliche CYPs des Cytochrom P450-Systems involviert.

In Abb. 2-4 sind die Reaktionswege von zwei weiteren Phase I-Enzymen dargestellt. Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) und Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) sind Monooxygenasen, die Ethylgruppen von ihren Substraten 7-Ethoxycoumarin bzw. 7-Ethoxyresorufin abspalten. Als Produkte entstehen 7-Hydroxycoumarin (Umbelliferon) bzw. Resorufin.

a)



b)

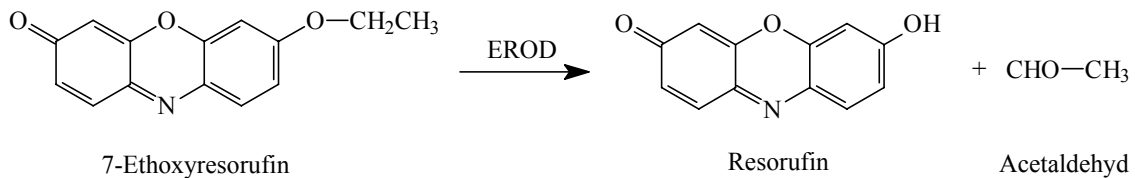


Abb. 2-4: Reaktionswege der Monooxygenasen a) ECOD und b) EROD.

2.2.4 Phase II-Metabolismus

Die Phase II-Reaktion ist die eigentliche Entgiftungsreaktion. Bei der sogenannten Konjugat-Bildung werden die Substrate (z.B. Bilirubin, Steroidhormone, Metabolite der Xenobiotika, Pharmaka) an sehr polare, negativ geladene Moleküle gebunden. Die beteiligten Enzyme sind ausnahmslos Transferasen (Koolman und Röhm 1998).

Die häufigste Konjugationsreaktion ist die Glucuronidierung durch die Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase (UGT). Die Verknüpfung mit dem polaren Glucuronat macht ein unpolares Molekül stärker polar, es wird dadurch ausreichend wasserlöslich und ausscheidungsfähig. Andere Phase II-Reaktionen sind die Veresterung mit Sulfat (Sulfotransferase, ST) und die Amid-Bildung mit Glycin und Glutamin. In Abb. 2-5 sind die Phase II-Reaktionen am Beispiel des Substrates 4-Methylumbelliferon dargestellt.

Das Enzym UGT ist ebenso wie die Enzyme der Phase I am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, während ST im Cytoplasma anzutreffen ist (Gibson und Skett 2001).

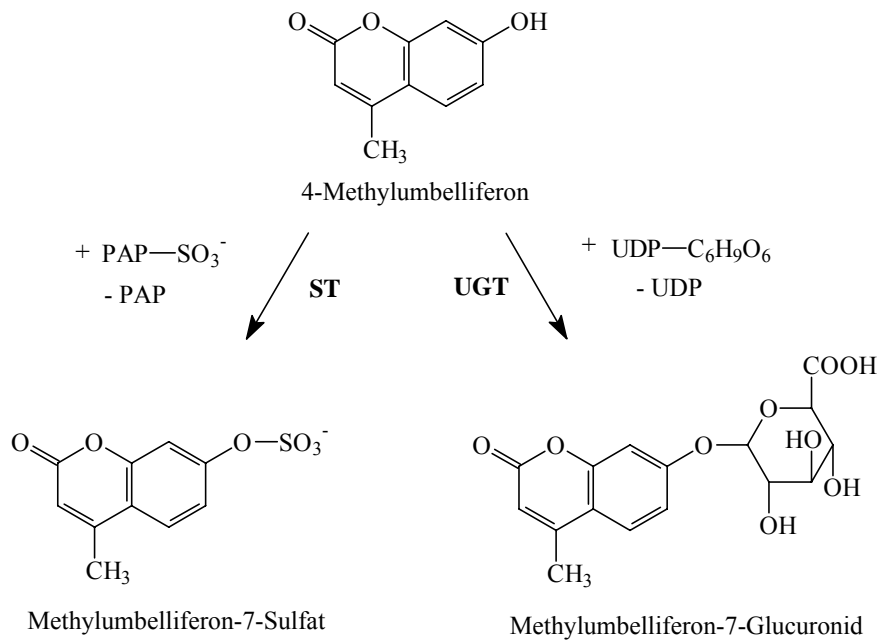


Abb. 2-5: Abbau von 4-Methylumbelliferon durch die Phase II-Enzyme UGT und ST. – PAP-SO₃⁻ 3'-Phospho-adenosin-5'-phosphosulfat, UDP-C₆H₉O₆ Uridindiphosphatglucuronat.

2.3 Anwendungen

Medizin:

Primäre Lebererkrankungen zählen weltweit zu den häufigsten Erkrankungen. Ein Problem dieser Erkrankungen ist, dass diese oft zur Entwicklung von Tumoren führen. Die operative Entfernung dieser Tumore ist bei geschädigtem Grundgewebe äußerst problematisch, da die Restkapazität der Leber häufig nicht ausreicht, um den Tumor unter Mitresektion eines genügend großen Randbereiches gesunden Gewebes zu resektieren. Die internationalen Bemühungen, eine bioartifizielle Leber zu entwickeln, wurden bisher durch die Erkenntnis motiviert, dass die verfügbaren Therapieverfahren bei akutem Leberversagen zu keinem klinisch befriedigenden Ergebnis führten und als einziger Ausweg die Lebertransplantation blieb (Kelly und Sussman 1994).

Verschiedene Arbeitsgruppen arbeiten daher an Überbrückungssystemen mit einem Einsatzbereich von 24 bis 48 Stunden bis zum Zeitpunkt der Verfügbarkeit einer für den Empfänger kompatiblen Spenderleber. Der Einsatzbereich einer bioartifiziellen Leber könnte jedoch um ein Vielfaches erweitert werden, wenn es gelingen würde, längerfristig stabile Bioreaktoren zu entwickeln, die für 1 – 2 Wochen extrakorporal eingesetzt werden könnten.

Die hohe Regenerationsfähigkeit der Leber ist seit langem bekannt. Ein längerfristiger Einsatz könnte dem Patienten genug Zeit geben, eine autologe Leberregeneration zu realisieren. Dies könnte insbesondere bei den oben erwähnten Tumorerkrankungen der Leber ausgedehntere und damit eventuell kurative Resektionen ermöglichen.

Bestandteil des therapeutischen Konzepts einer bioartifiziellen Leber ist, dass das Blut bzw. Plasma des Patienten durch die kultivierten Zellen möglichst wie durch die eigene Leber behandelt werden soll. So wird erwartet, dass Entgiftungsleistungen durch Cytochrom P450 abhängige Prozesse in den Hepatozyten ablaufen, denen Glucuronidierungen und Sulfatierungen nachgeschaltet sind. Das Plasma wird anschließend wieder vollständig an den Patienten zurückgegeben.

Besondere Anforderungen an eine bioartifizielle Leber liegen in der ständigen Verfügbarkeit für den Einsatz am Patienten und der Biokompatibilität. Eine Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz der bioartifiziellen Leber ist das Vorhandensein differenzierter Leberzellen in ausreichender Anzahl. Zur Zeit wird allgemein angenommen, dass eine bioartifizielle Leber ungefähr 30 % der gesamten Leistung der Leber *in vivo* erbringen sollte, um erfolgreich eingesetzt werden zu können, bei einem Erwachsenen würden somit etwa 7×10^{10} voll funktionsfähige Leberzellen erforderlich sein (Khalil et al 2001). Da humane Zellen wenig verfügbar sind, werden alternativ porcine Zellen oder Zelllinien in bioartifiziellen Lebern verwendet. Dabei sind insbesondere Probleme immunologischer Art beim Einsatz porciner Zellen und die Möglichkeit der Krankheitsübertragung (Viren beim Einsatz primärer Zellen, Tumorbildung beim Einsatz bestimmter Zelllinien, u.a.) zu berücksichtigen.

Pharmazeutische Industrie:

In der pharmazeutischen Industrie werden speziesspezifische Gerinnungsfaktoren oder Serumproteine benötigt, die idealerweise direkt von Hepatozyten produziert werden können.

In einem Produktionsbioreaktor sollen die Zellen in hohen Zelldichten kultiviert werden können, um hohe Produktkonzentrationen zu ermöglichen. Um eine Produkthemmung zu vermeiden ist häufig eine simultane Dialyse der Produkte notwendig.

Analytische Anwendungen:

Ein hepatisches *in vitro*-Modell muss verschiedenen Ansprüchen genügen. Es sollte über einen längeren Zeitraum stabil sein, um grundlegende Untersuchungen zum Primärstoffwechsel, z.B. Harnstoffzyklus oder Glukosehaushalt, durchführen zu können. Außerdem sollte es über ein intaktes Biotransformationssystem verfügen, um kinetische und toxikologische Untersuchungen von Pharmaka zu ermöglichen. Durch den Einsatz des Modells auf diesem Gebiet können Tierversuche vermieden oder ihre notwendige Anzahl zumindest verringert werden (Li et al 1997).

2.4 Kultivierung von Leberzellen

2.4.1 Historischer Überblick

Hepatozyten sind sehr anspruchsvoll und lassen sich nicht erfolgreich in einer stationären Suspension kultivieren, da sie ihre Differenzierung innerhalb weniger Stunden verlieren (Blaaubeer et al 1990). Eine Verbesserung der Kultivierungsbedingungen konnte durch Adhärenz erreicht werden. Dabei werden die Zellen entweder in Aggregaten oder auf Membranen kultiviert (Dunn et al 1991, Koebe et al 1994, Brown et al 1995).

Während die Kultivierung als Monolayer geeignet ist, die Zellvitalität für ein bis zwei Wochen zu erhalten, geht die Differenzierung der Zellen innerhalb weniger Tage verloren (Ehrmann und Ley 1986). Verschiedene Kultivierungsmethoden wurden entwickelt, welche die Kultivierung differenzierter Hepatozyten für zwei bis drei Wochen erlauben. Diese sind in den nächsten Abschnitten genauer beschrieben.

2.4.2 Die Sandwichkonfiguration

Wesentliche Vorteile konnten durch die Entwicklung des Sandwichmodells erzielt werden. Dabei wird insbesondere die Architektur der Leber berücksichtigt, um eine Verflachung der Zellen und dem damit einhergehenden Verlust der Polarisierung und letztendlich auch der Funktion zu vermeiden (Watanabe et al 1991).

Die Sandwichkonfiguration realisiert ein Maximum an Reorganisation der *in vivo*-Mikroarchitektur der Hepatozytenmonolayer. Dafür werden die Zellen auf einer

Collagenmatrix sedimentiert. Nach Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte und der Reorganisation der Gallengänge werden die Zellen durch Übersichtung mit einer zweiten Collagenschicht stabilisiert. In der klassischen Form des Sandwichs werden nur Hepatozyten zwischen den beiden Collagenschichten kultiviert (Dunn et al 1989). Dafür werden alle nicht-parenchymalen Zellen bei der Zellisolation durch eine aufwendige Percoll-Zentrifugation abgetrennt. Da es hier aber zum Verlust von einer Reihe von Leberfunktionen kommt, werden im modifizierten Sandwichmodell Kokulturen aus Hepatozyten und nicht-parenchymalen Zellen kultiviert, um der physiologischen Situation gerechter zu werden (Bader et al 1996). Hier können die leberspezifischen Funktionen über mehrere Wochen aufrecht erhalten werden (De Bartolo et al 2000).

2.4.3 Bioreaktoren

2.4.3.1 Kultivierung mittels Immobilisierung

Die Kultivierung differenzierter Hepatozyten erfordert eine dreidimensionale Umgebung. Eine Möglichkeit besteht in der Immobilisierung der Zellen, die zu Zellaggregaten führt. Sakai et al (1992, 1999) haben eine Methode entwickelt, bei der durch ein Rotationskultursystem Sphäroide gebildet werden. Alternativ wurden Leberzellen zusammen mit Collagen-beschichtetem Dextran, Polystyren oder Glasskörpern kultiviert, die als Zentrum für die Zellaggregation dienen (Kong et al 1996).

Naruse et al (1996a, 1998) schlugen ein anderes Bioreaktordesign vor, in dem Sphäroide porciner Hepatozyten auf einer Polyester-Matrix immobilisiert wurden. Diese Entwicklung erlaubt einen direkten Kontakt zwischen Hepatozyten und Medium und verbessert somit den Massentransfer. Der von Naruse et al entwickelte Bioreaktor präsentierte bessere metabolische und synthetische Funktionen für 24 Stunden als ein Hohlfaserreaktor, der Sphäroide in einer Suspensionskultur enthält. Ergebnisse über Langzeitkultivierungen sind noch nicht erhältlich.

Primäre Rattenhepatozyten wurden von Kino et al (1998) auf multiporösen Cellulose-Microcarriern kultiviert. Die Microcarrier hatten eine Porengröße von 100 µm und schützten die Zellen vor Scherstress. Die immobilisierten Hepatozyten wurden in einem neu entwickelten Rührkesselreaktor kultiviert. Die Sauerstoffversorgung erfolgte über einen externen Oxygenator. Die biochemische Performance der Zellen war vergleichbar mit denen einer Perfusionskultur.

Demetriou et al (Arnaout et al 1990) beschrieben einen Hohlfaserreaktor, in dem Microcarrier-gebundene Hepatozyten im extrakapillaren Raum auf der Oberfläche der Hohlfasermembranen kultiviert wurden (Abb. 2-6). Versuche mit dieser Anwendung, die als HepatAssist 2000 System verkauft wird, zeigten im Tierversuch Erfolge.

Im HepatAssist 2000 System wird Plasma vom Patienten durch einen Hohlfaserreaktor, der primäre porcine Hepatozyten enthält, perfundiert (Custer und Mullon 1998). Es ist mit einem kompletten Schlauchsatz, integriertem Oxygenator und Wärmetauscher, Plasmareservoir und der BAL2000 Hohlfaserkartusche ausgestattet. Kryokonservierte Hepatozyten werden aufgetaut und mit Cytodex-3-Microcarriern in den Bioreaktor gegeben. Es wurde ein Protokoll entwickelt, um die Funktionen des Systems während der Behandlung von Patienten zu simulieren. Dadurch konnten Sauerstoffverbrauchsraten und leberspezifische Funktionen (Metabolismus von Diazepam) bestimmt und die *in vitro* mit der *in vivo* Situation verglichen werden.

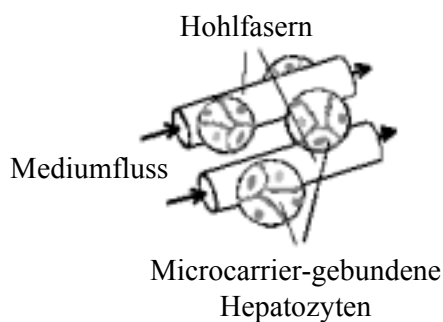


Abb. 2-6: Schematische Darstellung eines Bioreaktors mit Microcarrier-gebundenen Hepatozyten. Die Hohlfasern werden mit Medium perfundiert (modifiziert nach Dixit und Gitnick 1996).

Ein neues Konzept, das auf einem durchströmten Festbettreaktor basiert, wurde von Dore et al (Dore und Legallais 1999, Legallais et al 2000) entwickelt. Dieser Reaktortyp wird häufig für chemische Prozesse verwendet, um Wechselwirkungen und Austauschreaktionen zwischen Fest- und Flüssigphasen zu fördern. Alginatkörner bieten den Hepatozyten eine dreidimensionale Stützstruktur. Ein Scale-Up hängt nur von der Anzahl der Alginatkörner ab. Die Effizienz des Systems wurde *in vitro* und *ex vivo* im Tierversuch am Schwein als Modell für das akute Leberversagen getestet (Hwang et al 2000). Die in Alginat eingebetteten Hepatozyten behielten die meisten leberspezifischen Funktionen einschließlich Entfernung von Ammonium und Synthese von Harnstoff *in vitro* bei. Die Daten aus dem Tierversuch deuten darauf hin, dass das System den Anstieg von Ammonium im Serum und den intracraniellen Druck im Schwein bei akutem Leberversagen signifikant begrenzt.

2.4.3.2 Hohlfaserreaktoren

In letzter Zeit wurden viele verschiedene Hohlfaserreaktoren für die Kultivierung von Hepatozyten vorgestellt. Sussman et al (1992) schlugen ein Konzept vor, das die Kultivierung von Hepatomazellen auf der Außenseite von semipermeablen Hohlfasermembranen vorsieht (s. Abb. 2-7). Die Hohlfasern befinden sich gebündelt in einer Plastikhülle. Das Nährmedium zirkuliert durch die Hohlfasern, nachdem die Hepatozyten adhären geworden sind und eine Art Lebergewebe gebildet haben.

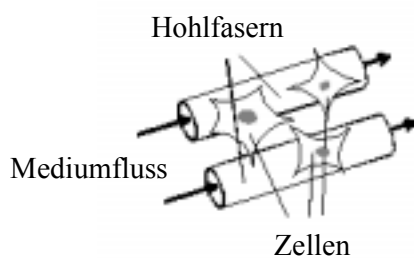


Abb. 2-7: Bioreaktorsystem von Sussman et al. Hepatomazellen werden auf der Oberfläche von semipermeablen Hohlfasermembranen kultiviert. Nachdem die Hepatozyten adhären und Gewebestrukturen gebildet haben, werden die Hohlfasern mit Medium perfundiert (modifiziert nach Dixit und Gitnick 1996).

Ein anderes Modell wurde von Nyberg et al (1992a) entwickelt. Dabei befinden sich primäre Hepatozyten in einem zylindrischen Collagengel im Inneren der Hohlfasern (s. Abb. 2-8). Diese Technologie erlaubt es, eine große Anzahl von Hepatozyten in dem Bioreaktor zu kultivieren. Weiterhin bietet das System ein dreidimensionales Netzwerk für die Hepatozyten, welches Zell-Zell-Kontakte erlaubt – wichtig für den Erhalt normaler hepatischer Funktionen der bioartifizierten Leber. Neuere *in vitro* Studien (Nyberg et al 1993) belegten eine signifikante Albuminproduktion und Cytochrom P450-Aktivität der Hepatozyten.

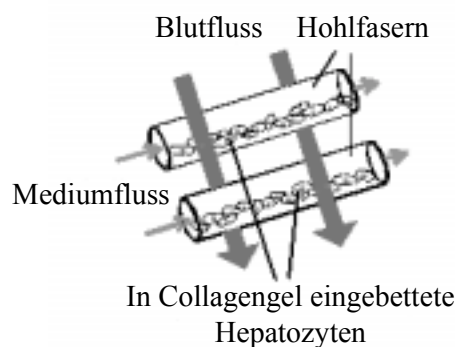


Abb. 2-8: Bioreaktorsystem von Nyberg et al. In Collagengel eingebettete Hepatozyten werden im Inneren von Hohlfasern kultiviert. Das Kulturmedium wird durch die Hohlfasern über die eingebetteten Hepatozyten perfundiert. Zwischen den Hohlfasern zirkuliert das Blut des Patienten.

Gerlach et al (1994a) haben ein System entwickelt, in dem porcine Hepatozyten auf der äußeren Oberfläche und zwischen vier miteinander verwobenen, Biomatrix-beschichteten Hohlfasersystemen kultiviert werden. Die Hohlfasersysteme sind in drei Ebenen im Winkel von 90° zueinander angeordnet und erfüllen unterschiedliche Funktionen. Das System enthält zusätzlich zu den Hepatozyten sinusoidale Endothelzellen und erlaubt eine dezentralisierte Zellperfusion und die unabhängige Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen und den Austausch von Metaboliten unter geringen Konzentrationsgradienten. Das von Gerlach et al entwickelte Kultivierungssystem verbessert Stofftransporte durch die Zellmasse hindurch erheblich. Die Hepatozyten formen spontan Aggregate und nehmen eine dreidimensionale Struktur während der Kultivierung im Bioreaktor an. Das System zeigte für bis zu vier Wochen *in vitro* leberspezifische Funktionen.

2.4.3.3 Kultursysteme mit dem Prinzip der Sandwichkonfiguration

Bader et al (2000, De Bartolo et al 2000) entwickelten einen Flachmembranreaktor, der aus einer Vielzahl zusammenschaltbarer Flachmembranmodule besteht (siehe Abb. 2-9). Jedes Modul hat eine Oxygenierungs- und Grundfläche von 1150 cm^2 . Bis zu 50 Module können zur Zeit parallel eingesetzt werden. Isolierte Hepatozyten werden zusammen mit nicht-parenchymalen Zellen kultiviert (Bader et al 1995, 1996). Die Leberzellen befinden sich in der Sandwichkonfiguration auf einer PTFE-Membran (Polytetrafluorethylen). Medium und Zellen werden in einem Inkubator mittels molekularer Diffusion durch die Membran oxygeniert. Das Design des Bioreaktors ist ebenfalls Grundlage für die bereits erfolgreich durchgeführte Kryokonservierung des Systems mit adulten primären humanen Leberzellen.

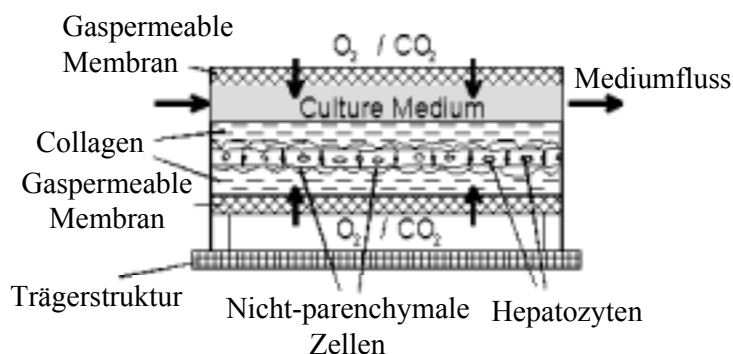


Abb. 2-9: Leberkultivierungssystem von Bader et al. Die primären Hepatozyten werden zusammen mit nicht-parenchymalen Zellen zwischen zwei Collagenschichten kultiviert. Medium und Zellen werden im Inkubator durch die gaspermeable Membran oxygeniert.

3 Material und Methoden

3.1 Arbeiten mit primären Hepatozyten

3.1.1 Isolierung

3.1.1.1 Entnahme der Leber

Die Spendertiere waren weibliche Schweine der deutschen Landrasse mit einem Durchschnittsgewicht von 20 kg. Die Tiere wurden ein Tag vor der Leberentnahme aus der Tierzuchtanstalt Mariensee / Neustadt in den Tierstall der Tierärztlichen Hochschule Hannover gebracht, um ihnen Zeit zur Erholung zu geben. Die Narkotisierung der Tiere und die Hepatektomie erfolgte nach dem heutigen OP-Standard (Siewert 1997). Nach dem Abklemmen der Pfortader wurde die Leber über eine Perfusionsnadel mit 2 L Ringerlösung (4 °C) perfundiert. Nachdem die Leber ausgeblutet war, wurde das Organ entnommen und die Gallenflüssigkeit durch Punktion abgesaugt. Die Leber wurde für die weiteren Arbeitsschritte in gekühlter Ringerlösung in das Labor gebracht.

3.1.1.2 Arbeiten im Labor

Die Leberzellisolierung erfolgte in Anlehnung an die von Seglen (1976) und Hoogenboom et al (1989) beschriebenen Methoden.

Lösungen:

Puffer I/II, pH 7,4:

8,3 g L ⁻¹ NaCl
0,5 g L ⁻¹ KCl
2,4 g L ⁻¹ HEPES

Puffer I wurde kurz vor der Isolation vorbereitet, indem 4 mL L⁻¹ EGTA (50 mM) zu Puffer I/II zugegeben wurde.

Puffer III, pH 7,4:

3,9 g L ⁻¹ NaCl
0,5 g L ⁻¹ KCl
2,4 g L ⁻¹ HEPES
2,0 g L ⁻¹ Glukose

Puffer IV, pH 7,4:	100	ml L ⁻¹	10x HBSS
	2,4	g L ⁻¹	HEPES
	2,0	g L ⁻¹	BSA
	1,0	g L ⁻¹	Glukose
	0,15	g L ⁻¹	CaCl ₂ · 2 H ₂ O

Alle Puffer wurden sterilfiltriert.

Durchführung:

Die Leber wurde durch eine große Perfusionsnadel in der Pfortader mit der auf 37 °C temperierten Isolationsanlage verbunden. Dabei wurde ein ständiger Fluss mit Puffer I aufrechterhalten. Das Organ wurde so schnell wie möglich in das Isolationsgefäß auf ein Netzblech gelegt. Dabei musste das Entstehen von Knicken in den Leberlappen vermieden werden. Dann wurde die Pumpe je nach Größe und Beschaffenheit der Leber auf bis zu 350 mL min⁻¹ eingestellt. Nachdem ungefähr 1,5 – 2 L Puffer I perfundiert worden waren, enthielt der austretende Puffer in der Regel kein Blut mehr. Anschließend wurde die gleiche Menge an Puffer II perfundiert.

Vor dem Start des Collagenase-Verdau wurden 500 mL Puffer III mit 250 mg Collagenase (Typ IV) versetzt. Kurze Zeit nach Zugabe von Puffer III in das Puffergefäß wurde die Anlage von Durchfluss auf Rezirkulation umgestellt. Nach 5 min wurden 2 mL 200 mM CaCl₂-Lösung pro 100 mL Puffer III zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min wurde mit einer Pinzette vorsichtig geprüft, ob erste Zellen in das Organ fielen. Wenn die Leber ausreichend angedaut war, wurde die Perfusion abgebrochen.

Das Organ wurde zur Weiterverarbeitung unter die sterile Werkbank gebracht. Dort wurde das Organ in kleine Stücke zerschnitten und mit sterilem, kaltem Puffer IV übergossen. Mit einer Pinzette wurde die Leberkapsel eingerissen und die Zellen mit Puffer herausgelöst. Zur Abtrennung der Einzelzellen von großen, nicht anwachsenden Zellaggregaten wurden Puffer und Zellen über ein 100 µm Gazesieb laufen gelassen. Das Becherglas mit Gazesieb stand zur Schonung der Zellen in einem Eisbad.

Die Zellsuspension wurde in 50 ml Röhrchen gegossen und bei 55 g zentrifugiert. Dann wurden die Zellen dreimal mit kaltem Puffer IV gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden sie in Medium anstelle von Puffer aufgenommen. Die Mediummenge richtete sich nach dem Gesamtpellet, so dass eine ungefähre Zellkonzentration von 1 – 2 x 10⁷ Zellen mL⁻¹ erreicht wurde.

3.1.2 Kultivierung

Lösungen:

Stammlösung:	9071	U mL ⁻¹	Penicillin
	6,22	mM	Streptomycin
	181,4	mM	Glutamin
	3,62	U mL ⁻¹	Insulin
	37,7	μM	Prednisolon
	0,09	μM	Glukagon
WE-Medium (komplett):	500	mL	WE-Medium
	27,2	mL	Stammlösung
	25	mL	FCS
DIF-Medium (komplett)	500	mL	DIF-Medium
	27,2	mL	Stammlösung

Kultivierungsablauf: siehe Kap. 3.3

3.2 Kultivierung von HepG2

Lösungen:

DMEM (komplett):	500	mL	DMEM
	50	mL	FCS
	5,5	mL	Penicillin / Streptomycin / Glutamin
PBS, pH 7,4:	8	g L ⁻¹	NaCl
	0,2	g L ⁻¹	KCl
	1,44	g L ⁻¹	Na ₂ HPO ₄
	0,24	g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄
Trypsin (1x):	1	VE	Trypsin (10x)
	9	VE	PBS

Kultivierung:

1 – 2 x 10⁶ Zellen wurden in einer 75 cm²-Zellkulturflasche mit 10 mL DMEM (komplett) ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit temperiertem PBS (37 °C) gewaschen, um die Zelldebris zu entfernen. Nach Zugabe von 10 mL Medium (37 °C) wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂, 20 % O₂ und 60 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Medium wurde zwei- bis dreimal die Woche gewechselt.

Passagieren der Zellen:

Bei normalem Wachstum wurden die Zellen alle fünf bis sieben Tage im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 0,5 ml Trypsin (1 %) auf die Zellen gegeben und die Kultur 5 min bei 37 °C inkubiert. Durch Klopfen an der Flasche und Resuspendieren in Medium wurden die Zellen vereinzelt. Nach Auszählen der Zellen wurden sie verdünnt und ausgesät.

3.3 Kultursysteme

3.3.1 Petrischale

3.3.1.1 Collagenherstellung

Das Collagen (Typ I) wurde aus Rattenschwänzen gewonnen, die bei –20 °C gelagert wurden. Für die Verarbeitung wurden sie in Wasser aufgetaut. Nach Abziehen der Haut wurden die Collagenfasern mit einer Klemme vom Schwanz abgedreht und in einer 1 % NaCl-Lösung gesammelt. Danach wurden die Fasern mit Wasser gespült und in einer gerührten 3 % Essigsäure bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Die aufgequollenen Fasern wurden entfernt, indem die Suspension über eine Gazebinde filtriert wurde. Anschließend wurde die Flüssigkeit eine Stunde bei 13000 g bei 4 °C zentrifugiert. Zu dem Überstand wurde über Nacht 1/5 VE 30 %iger NaCl-Lösung unter langsamen Rühren zugegeben. Am nächsten Tag wurde das Pellet nach 30 min Zentrifugation bei 4500 g bei 4 °C in einer Lösung mit 5 % NaCl und 0,6 % Essigsäure (50 ml pro Schwanz) resuspendiert. Dieser Schritt wurde mit 10 min Zentrifugation einmal wiederholt.

Die Collagenlösung wurde in Dialyseschläuche gefüllt und in 1 mM HCl ca. 5 Tage bei 4 °C unter täglichem Wechsel der Lösung gerührt. Das Collagen wurde in sterile Flaschen gefüllt

und 3 ‰ Chloroform hinzugefügt. Das Collagen musste solange mit leicht gelüftetem Deckel bei 4 °C ruhen, bis sich die Chloroformkügelchen vollständig aufgelöst haben (ca. 2 Tage).

Die Collagenlösung wurde mit 1 mM HCl auf eine Konzentration von 1,11 mg mL⁻¹ verdünnt. Als Sterilkontrolle wurde das Collagen mindestens zwei Wochen bei 37 °C inkubiert.

3.3.1.2 Versuchsaufbau

Zur Bildung der unteren Collagenschicht wurde 1 mL Collagenlösung in eine Petrischale (60 mm Durchmesser) gegeben. Die Collagenlösung wurde dazu unmittelbar vor Aufgabe aus 9 VE Collagenlösung (1,11 mg mL⁻¹) und 1 VE 10x DMEM auf Eis angesetzt und sofort aufgetragen. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Petrischalen bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

In einer Petrischale wurden 3 x 10⁶ Zellen in 3 mL WE-Medium (komplett, s. Kap. 3.1.2) ausgesät. Nach 1,5 bis 2 h wurde die Adhärenz der Zellen mikroskopisch beurteilt und das Medium gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen. Einen Tag nach der Isolation (1.Tag) erfolgte ein weiterer Mediumwechsel mit 3 mL WE-Medium. Am 2. Tag wurde das Medium entfernt, um 1 mL Collagenlösung zur Bildung der zweiten Schicht aufzugeben. Nach zwei Stunden Inkubation wurden 3 mL DIF-Medium (komplett, siehe Kap. 3.1.2) aufgegeben. Die weiteren Mediumwechsel fanden alle zwei Tage statt.

Die Inkubation der Leberzellen in der Sandwichkonfiguration erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 20 % O₂, 5 % CO₂ und 60 % H₂O.

3.3.2 Quadrox

Die generelle Eignung des Quadrox (s. Abb. 3-1) wurde anhand der Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten gezeigt. Der Aufbau des Quadrox wird detailliert in Kap. 4.1.1 beschrieben.

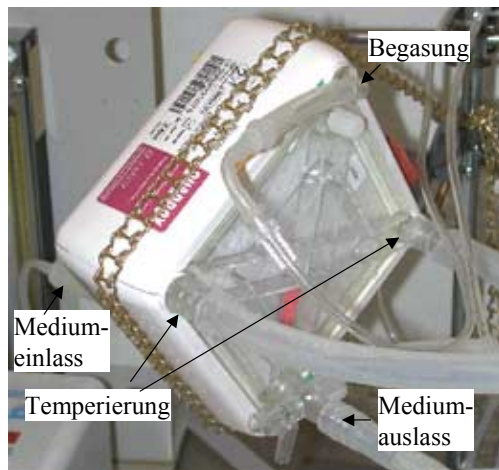


Abb. 3-1: Quadrox.

Versuchsaufbau:

In Abb. 3-2 ist der schematische Aufbau bei der Kultivierung von primären Leberzellen im Quadrox dargestellt. Das Medium wurde in einer kontinuierlichen Kulturführung mit 17 mL h^{-1} durch den Reaktor gepumpt, das entspricht ungefähr 400 mL Medium pro Tag. Gleichzeitig wurde das Medium rezirkuliert, um die Durchmischung zu verbessern und eine geringe Strömung über den Zellen aufrecht zu erhalten.

Der Quadrox wirkt als gleichzeitige Oxygenierungs- und Temperierungseinheit und wurde über ein externes Wasserbad temperiert. Somit war die Kultivierung unabhängig von einem Inkubator.

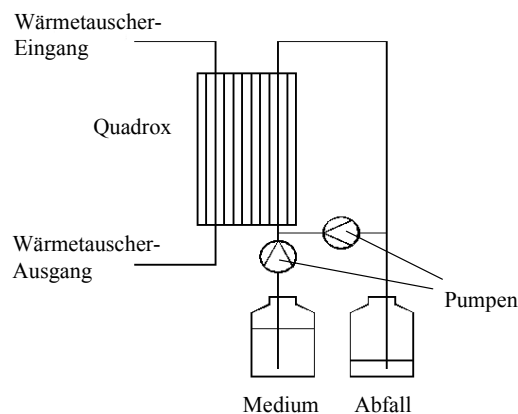


Abb. 3-2: Schematischer Versuchsaufbau bei der Kultivierung von primären Leberzellen im Quadrox.

Kultivierung:

Wenige Stunden vor dem Beginn der Kultivierung wurde der Quadrox mit WE-Medium (komplett, s. Kap. 3.1.2) befüllt, um eine vollständige Benetzung der Oberfläche zu erreichen. $2,5 \times 10^9$ primäre porcine Leberzellen wurden in 100 mL WE-Medium (komplett) aufgenommen und anschließend in den Quadrox gegeben. Während der nächsten zwei Stunden wurde der Quadrox alle paar Minuten gedreht, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen. Bioreaktoren ohne Zellen dienten als Kontrolle für Absorptionsprozesse und wurden parallel „kultiviert“.

Zwei Stunden nach Zellaufgabe wurde die Zufütterungspumpe mit 17 mL h^{-1} gestartet. Die Rezirkulation von 130 mL h^{-1} Medium wurde erst 24 Stunden nach Zellaufgabe gestartet, um die Differenzierung der Zellen zu fördern. Zu diesem Zeitpunkt sollten die vitalen Zellen adhärirt sein, so dass diese auch ohne ein Zellrückhaltungssystem nicht ausgespült werden. Der Mediumdurchsatz von 400 mL d^{-1} wurde während der gesamten Kultivierungsdauer von 22 Tagen konstant gehalten. Es wurden täglich Proben genommen, in denen Produktbildung, Substratverbräuche und Prozessparameter bestimmt wurden.

Zur Überprüfung des Phase I-Metabolismus wurde an den Tagen 7, 14 und 21 in das Mediumreservoir Diazepam gegeben, um eine Endkonzentration von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu erhalten. Das Diazepam-haltige Medium wurde für 24 Stunden mit der Zufütterungsrate von 17 mL h^{-1} in den Quadrox gepumpt. Am Ende der 24 Stunden wurden Proben aus den Bioreaktoren und deren Kontrollen genommen und in der HPLC analysiert.

Die Bioreaktoren wurden mittels eines externen Wasserbads auf 37°C temperiert. Die Oxygenierung erfolgte mit einem Gasgemisch aus 20 % O_2 , 5 % CO_2 und 75 % N_2 mit einer Begasungsrate von 15 mL min^{-1} .

Die Versuche wurden mit jeweils vier verschiedenen Bioreaktoren durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde der Quadrox mit mikroporösen Hohlfasern aus Polypropylen (PP) für die Oxygenierung verwendet. In der zweiten Versuchsreihe wurde der neue Quadrox D mit dichten Oxygenierungs-Hohlfasern aus Polymethylpenten (PMP) getestet.

3.3.3 Oxy-HFB

3.3.3.1 Herstellung

Mantel:

Der Bioreaktormantel bestand aus PMMA (Perspex) und wurde in der Werkstatt angefertigt. Der Aufbau mit den Maßen ist in Abb. 3-3 dargestellt.

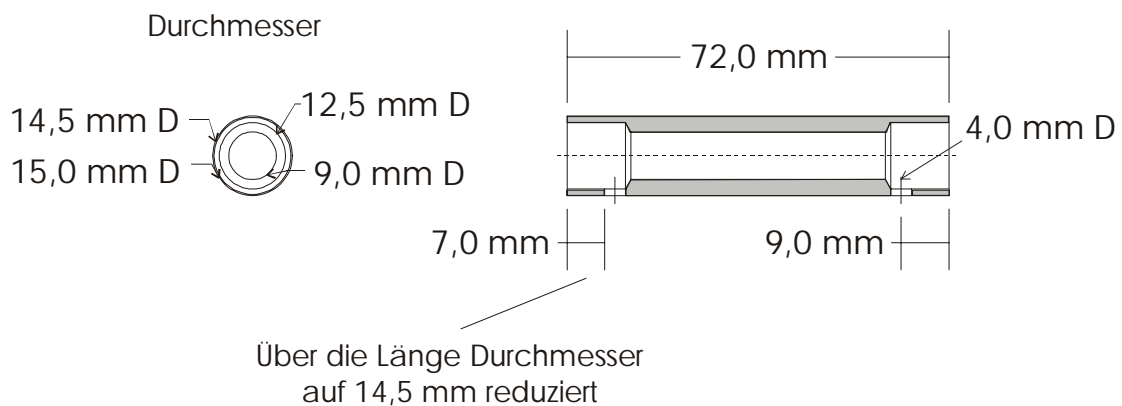


Abb. 3-3: Mantel für Oxy-HFB.

Kappe:

Für die Herstellung des Oxy-HFB wurden je zwei Kappen benötigt. Die Kappen wurden aus 10 ml Spritzen (Polypropylen) in der Werkstatt gefertigt. Der genaue Aufbau ist in Abb. 3-4 dargestellt.

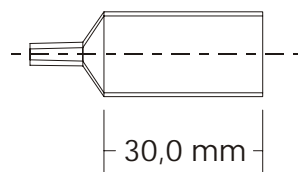


Abb. 3-4: Kappe für Oxy-HFB.

Zusammenbau:

Die Hohlfasermatte (HFM) wurde an den in Abb. 3-5 gekennzeichneten Stellen mit einem ca. 0,5 cm breiten Streifen eines doppelseitigen Klebebands versehen. Auf einen ca. 20 cm langen Draht (1,5 mm Durchmesser) wurden, wie in Abb. 3-5 gezeigt, zwei Stücke Schlauch

(1,6 mm Innendurchmesser, 3,2 mm Außendurchmesser) geschoben. Anschließend wurde die auf 120 mm Länge zugeschnittene Hohlfasermatte auf den Draht aufgerollt. Nach dem Entfernen des Drahts wurde in das Ende mit dem längeren Stück Schlauch vorsichtig ein ca. 4 cm langes Stück Draht geschoben. Dieser Draht sollte im weiteren Verlauf verhindern, dass Harz in den Schlauch gelangt. Die HFM-Rolle wurde nun in den Mantel geschoben und die Kappen auf beiden Seiten aufgesteckt.

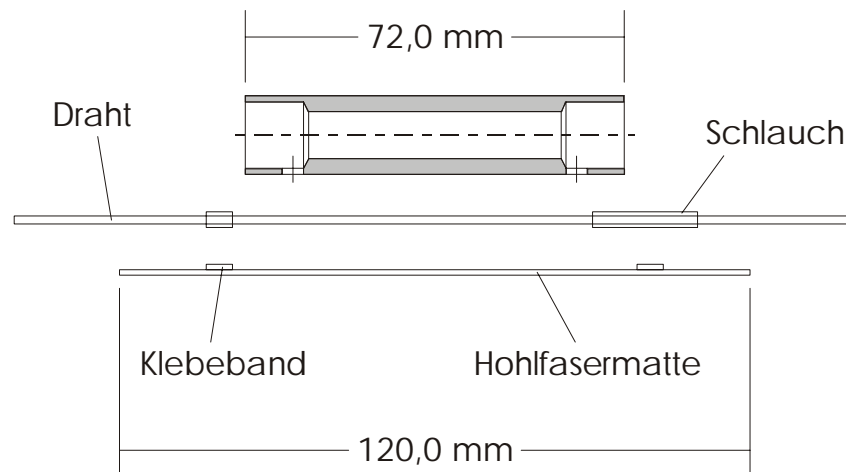


Abb. 3-5: Zusammenbau des Oxy-HFB.

Versiegeln mit Harz:

Der Oxy-HFB wurde hochkant in ein Stativ eingespannt und alles vorbereitet, da das Harz sich nur ca. 15 Minuten verarbeiten lässt.

Das Harz wurde aus 4,2 Gewichtsanteilen PUR 725A und 5,8 Gewichtsanteilen PUR 725 BF (Fa. Rohm and Haas) zusammengestellt. Das Harz wurde mit einem Spatel gut durchmischt und mit Hilfe eines Exikators entgast.

Mit Hilfe einer Spritze wurden ca. 2 ml Harz über die Kappe am unteren Ende des Oxy-HFB eingefüllt und die Öffnung mit einem Luer Lock Verschluss verschlossen. Nach 45 bis 60 min war das Harz soweit ausgehärtet, dass mit dem nächsten Schritt fortgefahren werden konnte. Nachdem der Oxy-HFB umgedreht worden war, konnte Harz wie oben beschrieben über die Kappe in das untere Ende des BR gegeben und die Öffnung mit einem Luer Lock Verschluss verschlossen werden. Für das weitere Vorgehen musste das Harz mind. 5 h aushärten.

Frisch angesetztes und entgastes Harz wurde mit Hilfe einer Spritze über eine Injektionsnadel vorsichtig über den seitlichen Zugang in das untere Ende des Oxy-HFB gegeben. Es wurde soviel Harz zugegeben, dass der Füllstand den seitlichen Zugang erreichte. Danach wurde

15 min bei etwa 200 g zentrifugiert. Nach einer Mindestaushärtungszeit von 5 h wurde der Oxy-HFB umgedreht und der Vorgang wiederholt.

Schneiden des Oxy-HFB:

Als erstes wurden die Kappen an den Bioreaktor-Enden bei der 1 ml-Markierung abgeschnitten und für die weitere Verwendung als Begasungsanschluss zur Seite gelegt. Der Oxy-HFB wurde an denselben Stellen unter Entfernung des Drahts geschnitten. Nach Entfernung der Kappenreste wurde er in der Werkstatt mit einem sauberen Schnitt auf eine Länge von 75 mm gebracht.

Vorbereitungen für die Sterilisation:

Der endgültige Zusammenbau des BR (s. Abb. 3-6) erfolgte als Vorbereitung für die Sterilisation. Dazu wurde der BR zuerst mit Ethanol gesäubert. Dann wurde die Kappe für die Begasung auf die Begasungsseite des BR gesteckt, die Konnektoren (Code 974.10, Vygon; von der Werkstatt angepasst) mit Araldit Rapid eingeklebt und ein Luer Lock Anschluss (männlich, 1,6 mm) in das BR-Ende gesteckt.

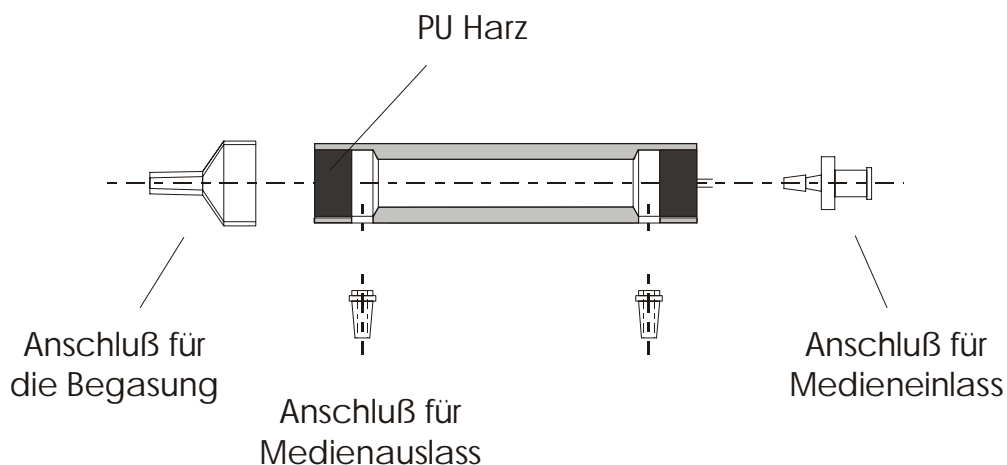


Abb. 3-6: Komponenten des Oxy-HFB

Die Sterilisation erfolgte mit Ethylenoxid in der Sterilzentrale der Medizinischen Hochschule Hannover.

3.3.3.2 Kultivierung von primären Hepatozyten

Die generelle Eignung des Oxy-HFB (s. Abb. 3-7) wurde anhand der Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten gezeigt. Wie schon beim Quadrox wurden zwei verschiedene Typen von Oxygenierungsfasern (mikroporöses Polypropylen und dichtes Polymethylpenten) getestet.



Abb. 3-7: Oxy-HFB.

Versuchsaufbau:

Der schematische Versuchsaufbau ist in Abb. 3-8 dargestellt. Der Oxy-HFB wurde im Inkubator kultiviert. Das Mediumvolumen von 12,5 mL wurde über die Schlauchlänge und -dicke eingestellt. Eine Multikanal-Pumpe sorgte für die Zirkulation des Mediums mit $7,5 \text{ mL h}^{-1}$. Über den Begasungszugang des Oxy-HFB wurde ein mit Wasser angefeuchtetes Gasgemisch aus 20 % O_2 , 75 % N_2 und 5 % CO_2 in das Reaktorinnere geleitet.

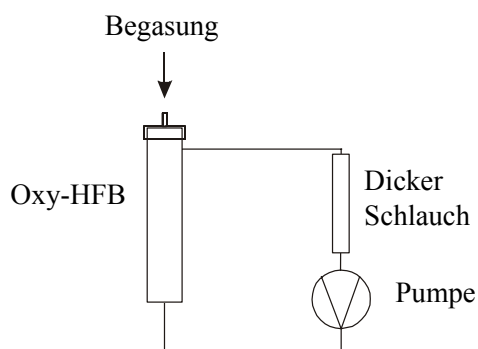


Abb. 3-8: Schematischer Versuchsaufbau.

Kultivierung:

Die Bioreaktoren wurden wenige Stunden vor der Zellaufgabe mit 2,5 mL WE-Medium (komplett) gefüllt. 5×10^7 Zellen in 2 mL Medium wurden pro Oxy-HFB mit einer Spritze in den Reaktor gegeben, das zellfreie Medium wurde dabei zum Teil aus dem Reaktor verdrängt.

Während der nächsten zwei Stunden wurden die Reaktoren alle paar Minuten in einer horizontalen Position gedreht, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen. Die Schlauchgarnitur für die Perfusion und die Erhöhung des Mediums von 2,5 mL im Oxy-HFB auf insgesamt 12,5 mL wurde erst am nächsten Tag angelegt. Der erste Mediumwechsel fand zum selben Zeitpunkt statt. Am zweiten Tag wurde das Medium von WE-Medium (komplett) auf DIF-Medium (komplett) umgestellt. Von nun an erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel inklusive Probenahme.

An den Tagen 2, 8 und 14 wurden die Substrate zur Testung der Biotransformationsleistungen aufgegeben. Dazu wurde in einem Bioreaktor die Aktivität von UGT/ST und in einem anderen nacheinander die ECOD- und EROD-Aktivität gemessen. Während der Inkubationsdauer von 4 h wurde die Strömungsgeschwindigkeit auf 30 mL h⁻¹ erhöht.

3.3.3.3 Variation des Mediumvolumen

Der Einfluss des Mediumvolumens auf die biochemische Leistung von primären porcinen Hepatozyten wird häufig vernachlässigt und wurde deshalb besonders im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit der Kontrolle untersucht. Die Versuche wurden wie unter Kap. 3.3.3.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden Oxy-HFBs mit Hohlfasern aus PMP verwendet, die mit 5×10^7 Zellen besiedelt wurden.

Die Bioreaktoren wurden mit unterschiedlichen Schlauchsystemen ausgestattet, so dass ein Gesamtmediumvolumen von 2,5, 12,5 und 50 mL zur Verfügung stand. Das Medium zirkulierte dabei ab dem ersten Tag nach der Zellaufgabe mit einer Geschwindigkeit von 7,5 mL h⁻¹. Da der Oxy-HFB ein Eigenvolumen von 2,5 mL besitzt, konnte mit einem Mediumvolumen von 2,5 mL die Zirkulation des Mediums nicht durchgeführt werden, so dass hier batchweise kultiviert wurde.

Die zur Verfügung stehende Mediummenge von 2,5 mL entspricht bei der eingesetzten Zellzahl einem Verhältnis von 0,05 mL Medium pro 10^6 Zellen, ein Mediumvolumen von 12,5 mL führt zu 0,25 mL 10^{-6} und 50 mL Mediumvolumen entsprechen einem Verhältnis von 1 mL 10^{-6} . In der mitgeführten Kontrolle (3×10^6 Zellen, 3 mL Medium, Petrischale) liegt ebenfalls ein Verhältnis von 1 mL 10^{-6} vor.

3.3.3.4 Variation der Strömungsgeschwindigkeit

Eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit kann im Bioreaktor zu einer besseren Durchmischung des Mediums und besseren Oxygenierungsleistungen führen. Gleichzeitig kann die Strömung dazu beitragen, die Differenzierung von primären Hepatozyten zu erhalten (Flendrig et al 1997a, Nyberg et al 1992b). Daher wurde die Strömungsgeschwindigkeit bei der Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten variiert, um so die Grenzen festzustellen.

Die Versuche wurden wie unter Kap. 3.3.3.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden Oxy-HFBs mit Hohlfasern aus PMP verwendet, die mit 5×10^7 Zellen besiedelt wurden und 12,5 mL Medium enthielten. Die getesteten Strömungsgeschwindigkeiten betrugen 7,5, 15 und 60 mL h^{-1} und wurden ab dem ersten Tag nach der Zellaufgabe beigegehalten.

3.3.3.5 Variation der Zelldichte

Bei der Erhaltung der Differenzierung von primären Hepatozyten spielen Zell-Zell-Kontakte eine wesentliche Rolle (Sajiki et al 2000). Andererseits darf die Zelldichte auch nicht zu hoch werden, da Limitationen bei der Oxygenierung und den Transportvorgängen von Substraten und Produkten wahrscheinlicher werden.

In Kap. 3.3.3.2 sind die allgemeinen Kultivierungsbedingungen beschrieben. Es wurden wieder Hohlfasern aus PMP verwendet und die Strömungsgeschwindigkeit betrug $7,5 \text{ mL h}^{-1}$. Es wurden die Zelldichten 2, 4 und 6×10^7 Zellen pro mL getestet, die einer eingesetzten Zellzahl von 5, 10 und 15×10^7 Zellen entsprechen. Das eingesetzte Mediumvolumen wurde im Verhältnis zur eingesetzten Zellzahl konstant gehalten, das heißt, es wurden entsprechend 12,5, 25 und 37,5 mL eingesetzt (Variation des Schlauchsystems).

3.3.3.6 Kultivierung von HepG2

Die Kultivierung der Leberzelllinie HepG2 sollte zeigen, dass der Oxy-HFB auch für die Expansion von Zellen geeignet ist.

Einige Zeit vor der Zellaufgabe wurde der Oxy-HFB mit Hohlfasern aus Polypropylen mit DMEM (komplett) gefüllt. In drei Bioreaktoren wurden je $1,8 \times 10^6$ Zellen gegeben und anschließend über Nacht mit 1 rpm auf einer Rollerapparatur gedreht. Bis zum nächsten Tag wurde mit 2,5 mL DMEM (komplett) im Inkubator bei 37°C kultiviert. Die folgende

Kultivierung wurde durchgeführt, wie bei primären porcinen Hepatozyten beschrieben (Kap. 3.3.3.2). In Tab. 3-1 ist das eingesetzte Mediumvolumen über den Kultivierungszeitraum aufgeführt. Ab dem 10. Tag wurde in das Schlauchset eine Vorratsflasche integriert.

Die Oxygenierung wurde mit einer Begasungsrate von 10 mL min^{-1} mit 20 % O_2 , 75 % N_2 und 5 % CO_2 sichergestellt. Als Kontrolle wurden gleichzeitig HepG2 in Zellkulturflaschen (75 cm^2) kultiviert. Die Kultivierung in Zellkulturflaschen wurde nach drei Wochen beendet, da die Zellen tot waren. Nach 56 Tagen wurde die Kultur in den Bioreaktoren abgebrochen.

Tab. 3-1: Eingesetztes Mediumvolumen bei der Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB.

Tage in Kultur	Eingesetztes Mediumvolumen [mL/d]
1	2,5
2 – 9	10
10 – 19	15
20 – 28	20
29 – 35	25
36 – 42	30
43 – 56	40

Nach dem Abbruch der Kultivierung wurden die Bioreaktoren zweimal mit PBS gewaschen. Durch gründliches Spülen mit 0,3 M NaOH wurden die lysierten Zellen aus dem Bioreaktor herausgeholt und in insgesamt 200 mL Flüssigkeit gesammelt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 3.4.1.2) konnte auf die erreichte Gesamtzellzahl im Bioreaktor geschlossen werden.

3.4 Analytik

3.4.1 Zellzahlbestimmung

3.4.1.1 Trypanblau-Ausschlußtest

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 20 μL der Zellsuspension mit 80 μL Trypanblau und 100 μL NaCl (0,9 %) gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Das Trypanblau gelangt durch die Membran toter Zellen und interkaliert in die DNA. Somit erscheinen tote Zellen im Mikroskop blau und lebende Zellen gelb. Die Zellen von vier Außenquadraten wurden gezählt und das Ergebnis gemittelt. Die Multiplikation mit 100.000 ergab die Zellzahl pro mL. Die Vitalität der Zellen wurde bestimmt, indem die Zahl der lebenden Zellen durch die Gesamtzellzahl dividiert wurde.

3.4.1.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde mit einem Bicinchoninic Acid (BCA) Kit von Sigma (BCA-1) bestimmt und mit der über den Trypanblau-Ausschlusstest erhaltenen Zellzahl korreliert (Metzen 1995).

Prinzip:

Abhängig von der Proteinkonzentration in der Probe wird alkalisches Cu (II) zu Cu (I) reduziert. BCA ist ein hochspezifisches chromogenes Reagenz für Cu (I), das einen purpurnen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm bildet.

Durchführung:

Die Probenanalyse fand in 96 well-Platten als Dreifachbestimmung statt. Es wurden je 20 μL Proteinstandards mit den Konzentrationen 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und Standards mit 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5 und 2×10^6 Zellen mL^{-1} je well pipettiert. Zu den Standards wurden 10 μL 1 M NaOH gegeben, um dieselben Bedingungen wie im Probenmaterial herzustellen. Weiterhin wurde je 30 μL Probenvolumen aufgegeben.

Das BCA wurde mit 4 % CuSO_4 -Lösung im Verhältnis 1:50 (v/v) gemischt und je 250 μL je well zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Proteinkonzentration im ELISA-Reader bei 550 nm bestimmt und mit der Zellzahl korreliert.

3.4.2 Primärmetabolite

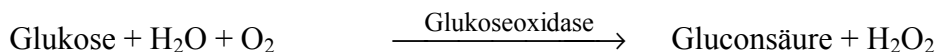
Alle Konzentrationen wurden mittels einer Dreifachbestimmung bestimmt. Die Proben wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Messung gelagert. Die Bestimmung von LDH erfolgte unmittelbar nach der Probenahme.

3.4.2.1 Glukose

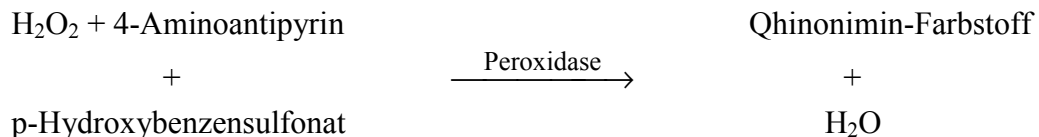
Die Glukosekonzentration wurde mit Hilfe eines Kits von Sigma (Glucose (Trinder), Methode-Nr. 315) bestimmt.

Prinzip:

Unter Mitwirkung von Glukoseoxidase wird Glukose zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert:



Das gebildete Wasserstoffperoxid reagiert in Gegenwart von Peroxidase mit 4-Aminoantipyrin und p-Hydroxybenzensulfonat zu einem Qhinonimin-Farbstoff:



Die Bildung des Qhinonimin-Farbstoffs mit einem Absorptionsmaximum bei 505 nm kann photometrisch bestimmt werden und ist direkt proportional der Glukosekonzentration in der Probe.

Durchführung:

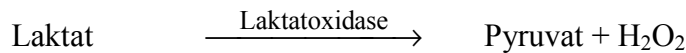
Der Test wurde in 96 well-Platten durchgeführt. Die Eichgerade wurde aus dem Blank und den Standards der Konzentrationen 100, 200, 300, 400, 500, 600 und 750 mg dL⁻¹ bestimmt. Für die Messungen wurden jeweils 1 µL Blank bzw. Probe und 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7,5 µL einer 100 mg dL⁻¹ Glukoselösung aufgegeben. Danach wurden 200 µL der Reagenzlösung aus dem Kit mit der Multikanalpipette zugegeben. Die Messung bei 490 nm erfolgte nach 18 min Inkubation bei Raumtemperatur. Der Korrelationskoeffizient der ermittelten Eichgerade betrug in der Regel mindestens 0,9998.

3.4.2.2 Laktat

Die Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgte mittels eines Kits von Sigma (Methode-Nr. 735).

Prinzip:

Laktat wird durch Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid umgewandelt:



In Gegenwart von Peroxidase katalysiert H_2O_2 die Bildung eines Farbstoffs, der bei 540 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Der bei 540 nm gemessene Absorptionsanstieg ist direkt proportional zur Laktatkonzentration der Probe.

Durchführung:

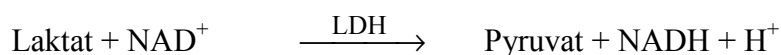
Die Tests wurden in 96 well-Platten durchgeführt. Zur Bestimmung der Konzentrationen wurde eine Eichgerade aus Standards mit den Laktatkonzentrationen 5, 10, 20, 30, 40, 80 und 120 mg dL⁻¹ ermittelt. Dazu wurden 2 µL Standard bzw. Probe in die 96 well-Platte gegeben. Anschließend wurden 200 µL Reagenzlösung aus dem Kit mit der Multikanalpipette aufgegeben. Nach einer Inkubation von 5 – 10 min wurde die Messung bei 540 nm im ELISA-Reader durchgeführt. Der Farbstoff blieb weitere 10 min stabil. Der Korrelationskoeffizient betrug in der Regel mindestens 0,998.

3.4.2.3 LDH

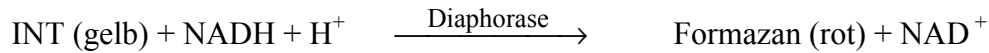
Die LDH-Konzentration wurde mittels eines Cytotoxicity Detection Kits (LDH) von Roche (Cat. No. 1 644 793) aus dem Überstand bestimmt.

Prinzip:

In einem ersten Schritt wird von der Laktatdehydrogenase (LDH) Laktat in Pyruvat umgesetzt:



Dabei wird NAD^+ reduziert. Im zweiten Schritt transferiert der Katalysator Diaphorase das H/H^+ vom $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf das Tetrazolium-Salz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), das zum Formazan reduziert wird:



Die Zunahme an Formazan kann bei 490 nm bestimmt werden und ist direkt proportional zur LDH-Aktivität.

Lagerung der Proben:

Proben für die LDH-Messung wurden so schnell wie möglich gemessen. Sie wurden maximal einen Tag bei 4 °C gelagert.

Durchführung:

Die Bestimmungen der LDH-Aktivität wurden in einer 96 well-Platte durchgeführt. Dafür wurden 100 μL Standard bzw. Probe je well aufgegeben. Die Eichgerade wurde aus dem Blank und den frisch angesetzten Standards der Konzentrationen 5, 10, 20, 30, 50 und 70 U L^{-1} bestimmt.

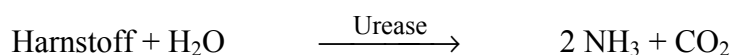
Für eine halbe 96 well-Platte wurden 250 μL Katalysator zu 11,25 mL Färbelösung gegeben. Von dem Reaktionsgemisch wurden 100 μL je well aufgegeben und im Dunkeln inkubiert. Nach genau 30 min wurden die LDH-Aktivitäten bei 490 nm vs. 630 nm im ELISA-Reader mit Hilfe der Standardreihe bestimmt.

3.4.2.4 Harnstoff

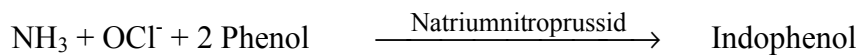
Die Bestimmung des Harnstoffs erfolgte mit Hilfe eines Kits von Sigma (Methode-Nr. 640).

Prinzip:

Das Enzym Urease katalysiert die Umwandlung von Harnstoff und Wasser zu Ammoniak und Kohlendioxid:



Ammoniak reagiert in Gegenwart von Natriumnitroprussid mit alkalischem Hypochlorit und Phenol zu Indophenol:



Der blaue Farbstoff Indophenol weist ein Absorptionsmaximum bei 570 nm auf. Änderungen in der Absorption sind direkt proportional zur Harnstoffkonzentration in der Probe.

Durchführung:

Die Tests wurden in 96 well-Platten durchgeführt. Zur Evaluierung wurde auf jeder Platte eine interne Standardreihe mitgeführt. Aus dem Blank und den Harnstoffstickstoff-Standards von 5, 10, 20, 30, 45, 60 und 75 mg dL⁻¹ wurde die Eichgerade ermittelt.

Für die Messungen wurden 1 µL Standard bzw. Probe in die 96 well-Platte gegeben. Nach Zugabe von 50 µL Urease-Lösung pro well folgte eine Inkubation bei 37 °C für 10 Minuten. Anschließend wurden 100 µL Phenolnitroprussid-Lösung und 100 µL alkalische Hypochlorit-Lösung zugegeben. Nach 20 bis 30 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung bei 540 nm im ELISA-Reader. Der Farbstoff ist mind. 1 h lang stabil. Der Korrelationskoeffizient der Standardreihe betrug in der Regel mind. 0,9995.

Einheiten:

Bei diesem Messverfahren wird der Harnstoffstickstoff bestimmt. Deshalb mussten die ermittelten Daten mit 2.14 multipliziert werden, um den Harnstoffgehalt in mg dL⁻¹ zu erhalten. Bei einem Molekulargewicht von 60 g mol⁻¹ entspricht 1 mg dL⁻¹ Harnstoff 0,183 mmol L⁻¹.

3.4.2.5 Albumin

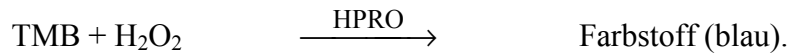
Die Albumin-Konzentration wurde mit Hilfe eines kompetitiven ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, Dunn et al 1989) in 96 well-Platten bestimmt.

Prinzip:

Die wells einer Mikrotiterplatte sind mit speziesspezifischem Albumin beschichtet. In die Mikrotiterplatte werden Standards und Proben mit einer Lösung aus HRPO-konjugiertem

(Horseradish Peroxidase) Antikörper gleichzeitig vorgelegt. Während der Inkubation kommt es zu einer kompetitiven Reaktion zwischen dem an die Festphase gebundenen und dem freien Albumin der Probe mit dem spezifischen markierten Antikörper.

Der Antikörper ist HRPO-konjugiert und katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Reaktion von Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff:



Diese Reaktion wird durch die pH-Änderung bei Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, dabei wird der blaue Farbstoff gelb. Das Produkt besitzt ein Absorptionsmaximum bei 490 nm und kann photometrisch nachgewiesen werden. Der Nachweis ist umgekehrt proportional zur Albuminkonzentration der Proben.

Lösungen:

Coating-Puffer, pH 9,6:	1,61 g L ⁻¹	Na ₂ CO ₃
	2,93 g L ⁻¹	NaHCO ₃
	0,05 g L ⁻¹	zellspezifisches Albumin (frisch zugesetzt)
Blocking-Puffer:	10 %	FCS in 1x TPBS
5x TPBS, pH 7,4:	40 g L ⁻¹	NaCl
	1 g L ⁻¹	KCl
	1 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄
	7,15 g L ⁻¹	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
	2,50 g L ⁻¹	Tween 20
Antikörperlösung:	0,35 mg L ⁻¹	zellspezifischer Antikörper (HRPO-konjugiert)
	in 1x	TPBS

Färbelösung, pH 5,0:	5,10 g L ⁻¹	Zitronensäure-Monohydrat
	13,78 g L ⁻¹	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
Tetramethylbenzidin:	2 mg mL ⁻¹	TMB in DMSO
Stopplösung:	8 N	H ₂ SO ₄

Vorbereitung der ELISA-Platte:

Mit einer Multikanalpipette wurden 100 µL Coating-Puffer in eine 96 well-Platte (Maxisorb, Nunc) gegeben. Über Nacht wurde die ELISA-Platte bei 4 °C inkubiert und anschließend ausgeschlagen. Nachdem 200 µL Blocking-Puffer pro well aufgegeben worden waren, erfolgte eine Inkubation von 1 h bei 37 °C. Der Blocking-Puffer wurde durch viermaliges Waschen mit kaltem 1x TPBS entfernt. Vor einer Lagerung bei -20 °C oder der Probenaufgabe wurde die Platte gründlich ausgeschlagen.

Versuchsablauf:

Die Standardreihe umfasste die folgenden Konzentrationen (speziesspezifisch):

humanes Albumin: 0 / 0,5 / 1,0 / 2,5 / 5,0 / 10 / 20 / 30 µg mL⁻¹

porcines Albumin: 0 / 20 / 30 / 40 / 50 / 60 / 70 / 80 µg mL⁻¹

Die Standardlösungen wurden in der doppelten Konzentration angesetzt und bei serumhaltigen Proben mit der entsprechenden Menge an FCS (in TPBS) angereichert. Pro well wurden 100 µL Standard bzw. Probe aufgegeben. Anschließend folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht. Die Platte wurde ausgeschlagen und viermal mit kaltem 1x TPBS gewaschen. Zum Schluss wurde die Platte wieder gründlich ausgeschlagen.

Zur Färbelösung wurden 50 µL mL⁻¹ TMB und 3 µL mL⁻¹ H₂O₂ (30%) gegeben. Davon wurden 100 µL je well pipettiert. Nach 7 min wurde die Färbereaktion mit 50 µL Stopplösung je well gestoppt. Die Albuminkonzentrationen wurden im ELISA-Reader bei 450 nm vs. 630 nm bestimmt. Der Korrelationskoeffizient der Standardreihe betrug in der Regel mind. 0,97.

3.4.3 Biotransformation

3.4.3.1 Diazepam

Prinzip:

Das Substrat Diazepam wird von Phase I-Enzymen des Cytochrom P450-Systems über die Zwischenprodukte Nordazepam und Temazepam (siehe Abb. 2-3) zu dem Produkt Oxazepam abgebaut. Sowohl das Substrat Diazepam als auch die Produkte sind mittels HPLC messbar (Lauber et al 1994).

Kultivierung:

Das Kulturmedium wurde mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Diazepam angesetzt und für eine Inkubationsdauer von 24 h zu den Zellen gegeben. Bis zur Aufarbeitung und Messung wurde der Medium-Überstand bei -20°C eingefroren.

Lösungen:

Messwasser, pH 7,0:	0,04 vol % Trimethylamin
Fließmittel:	25 % Methanol, 35 % Acetonitril, 40 % Messwasser
Diazepam:	10 mg mL^{-1} in DMSO

Extraktion:

Es wurde je 1 mL der aufgetauten Proben in ein Glasröhrchen pipettiert. Dazu wurden $10 \mu\text{L}$ Midazolam als interner Standard (Endkonzentration $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) und $20 \mu\text{L}$ 4 M Natronlauge gegeben. Zum Fällern der Proteine wurden $100 \mu\text{L}$ Isopropanol (bei serumhaltigen Medien $300 \mu\text{L}$) addiert und die Proben anschließend gut gevortext. Nach Zugabe von 5 mL Ethylacetat wurden die Proben für 30 min im Rotor gedreht. Danach folgte eine Zentrifugation bei 200 g für 15 min. Es wurden 4,5 mL der Ethylacetatphase mit Hilfe von Stickstoff-Begasung eingedampft. Anschließend wurde die Probe bis zur HPLC-Analyse bei -20°C gelagert.

HPLC-Analyse:

Die aufgetauten Proben wurden für die Analyse in $120 \mu\text{L}$ Fließmittel aufgenommen, gut gevortext und kurz in der Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. Das Probenvolumen von $120 \mu\text{L}$ wurde in ein HPLC-Röhrchen gegeben.

Die HPLC enthielt die Säule LiChrospher 100RP-18e (5 μm). Es wurde bei einer Wellenlänge von 236 nm gemessen.

Während der Messung wurde folgender Gradient für das Laufmittel aus Methanol (MeOH), Acetonitril (ACN) und Messwasser vorgegeben:

0 min		25 % MeOH,	34 % ACN,	41 % H ₂ O
0 - 14 min	Gradient auf	23 % MeOH,	36 % ACN,	41 % H ₂ O
14 - 19 min	Gradient auf	0 % MeOH,	80 % ACN,	20 % H ₂ O
19 - 24 min	Gradient auf	0 % MeOH,	100 % ACN,	0 % H ₂ O
24 - 27 min		0 % MeOH,	100 % ACN,	0 % H ₂ O
27 - 32 min	Gradient auf	25 % MeOH,	34 % ACN,	41 % H ₂ O
32 - 35 min		25 % MeOH,	34 % ACN,	41 % H ₂ O

Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,8 mL min⁻¹. Die Evaluierung der Methode erfolgte mit Hilfe folgender Eichreihen:

Oxazepam:	5 / 10 / 50 / 100 / 200 / 500 / 1000 / 2000	ng mL ⁻¹
Nordazepam:	25 / 50 / 250 / 500 / 1000 / 2500 / 5000 / 10000	ng mL ⁻¹
Temazepam:	25 / 50 / 250 / 500 / 1000 / 2500 / 5000 / 10000	ng mL ⁻¹
Diazepam:	50 / 100 / 500 / 1000 / 2000 / 5000 / 10000 / 20000	ng mL ⁻¹

Die ungefähren Retentionszeiten der Substanzen betrugen bei dieser Methode:

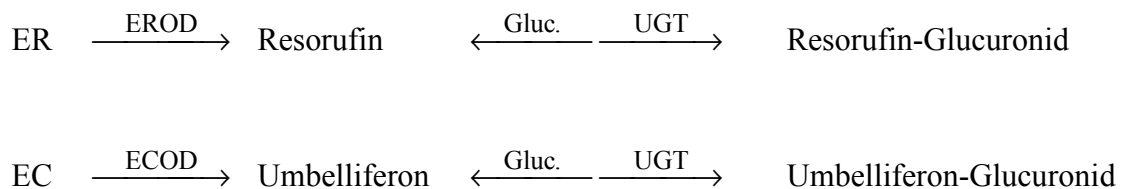
Oxazepam:	7,4 min
Nordazepam:	8,6 min
Temazepam:	10,0 min
Midazolam:	11,3 min
Diazepam:	12,6 min

3.4.3.2 ECOD / EROD

Prinzip:

ECOD (Ethoxycoumarin-O-deethylase) und EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) sind zwei Substrat-unspezifische Monooxygenasen, die Phase I-Reaktionen katalysieren (siehe Kap. 2.2.3). 7-Ethoxycoumarin (EC) und 7-Ethoxyresorufin (ER) wurden als Substrate verwendet. Beide Enzyme spalten die Ethylgruppe ihrer Substrate ab, so dass die Produkte Umbelliferon bzw. Resorufin und Acetaldehyd entstehen, die fluorimetrisch nachzuweisen sind.

Ethoxyresorufin wird außer von EROD auch noch von einem zweiten Enzym, der DT-Diaphorase, umgesetzt. Zur Hemmung dieses Enzyms wurde dem Medium neben dem Ethoxyresorufin auch noch Dicumarol zugesetzt.



Das Phase II-Enzym UGT glukuronidiert die Produkte Umbelliferon und Resorufin. Diese Reaktion wird von dem Enzym β -Glucuronidase (Gluc.) rückgängig gemacht, das der Hälfte des Probenvolumens zugesetzt wird. Somit können mit dieser Methode nicht nur Angaben über die Aktivitäten der Phase I-Enzyme ECOD und EROD, sondern auch über die Aktivität des Phase II-Enzyms UGT gemacht werden.

Kultivierung:

Das Kulturmedium wurde mit Ethoxycoumarin ($c_{\text{end}} = 70 \mu\text{M}$) bzw. mit Ethoxyresorufin und Dicumarol (jeweils $c_{\text{end}} = 30 \mu\text{M}$) versetzt und für eine Inkubationsdauer von 4 h zu den Zellen gegeben. Proben des Überstandes wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Lösungen:

Ammoniumacetat-Puffer, pH 4,5: 200 mM NH_4Ac

β -Glucuronidase-Lösung: 100 U mL^{-1} in Ammoniumacetat-Puffer

Glycinpuffer, pH 10,3:	1,6 M Glycin 1,3 M NaOH
Ethoxycoumarin:	10 mg mL ⁻¹ in DMSO
Ethoxyresorufin:	1 mg mL ⁻¹ in DMSO
Dicumarol:	10 mg mL ⁻¹ in DMSO

Durchführung:

Die Messungen wurden in 96 well-Platten vorgenommen. Die Eichreihen wurden aus folgenden Standards gebildet:

Umbelliferon: 0 / 0,1 / 0,5 / 1 / 3 / 5 / 10 / 30 μM

Resorufin : 0 / 10 / 50 / 100 / 300 / 500 / 1000 / 3000 nM

Es wurden 60 μl Standard bzw. Probe in die wells gegeben. Dabei wurden parallel zwei gleiche 96 well-Platten vorbereitet. In die eine Platte wurde 60 μL Ammoniumacetat-Puffer gegeben, in die andere 60 μL β-Glucuronidase-Lösung. Nach gründlichem Mischen erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Mit der Multikanalpipette wurden am nächsten Tag 180 μL Glycinpuffer je well aufgegeben. Im ELISA-Fluorimeter wurde die Fluoreszenz von Resorufin bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 580 nm bestimmt, die von Umbelliferon wurde mit 360 nm angeregt und bei 460 nm gemessen.

3.4.3.3 UGT / ST

Prinzip:

Die wichtigsten Konjugationen der Phase II sind die Kopplung mit Glucuronsäure, katalysiert von der UDP-Glucuronosyltransferase (UGT), und der Kopplung mit Schwefelsäure, katalysiert von der Sulfotransferase (ST). Beide Reaktionen können mit OH-Gruppen ablaufen, so dass einige Substrate von beiden Enzymen umgesetzt werden, wie das in dieser Methode eingesetzte 4-Methylumbelliferon (MU, s. Abb. 2-5). Die beiden Produkte

Methylumbelliferon-7-Glucuronid (MUG) und Methylumbelliferon-7-Sulfat (MUS) und das Substrat MU sind mittels HPLC messbar.

Kultivierung:

Medium mit 4-Methylumbelliferon ($c_{\text{end}} = 100 \mu\text{M}$) wurde für 4 h auf den Zellen inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und Proben bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Lösungen:

Ammoniumacetat-Puffer, pH 7,0: 50 mM NH_4Ac

4-Methylumbelliferon: 100 mM in DMSO

HPLC-Analyse:

Vor der Analyse wurde die Probe mit einem $0,2 \mu\text{m}$ Filter (Minisart RC 4) aufgereinigt. Es wurde ein Probenvolumen von $120 \mu\text{L}$ aufgegeben und in der HPLC bei einer Wellenlänge von 336 nm analysiert. Die HPLC enthielt die Säule LiChrospher 100RP-18e ($5 \mu\text{m}$).

Während der Analyse wurde das Laufmittel nach folgendem Gradienten aus NH_4Ac und Acetonitril (ACN) variiert:

0 - 6 min		100 % NH_4Ac , 0 % ACN
6 - 15 min	Gradient auf	60 % NH_4Ac , 40 % ACN
15 - 17 min		60 % NH_4Ac , 40 % ACN
17 - 20 min	Gradient auf	50 % NH_4Ac , 50 % ACN
20 - 28 min	Gradient auf	0 % NH_4Ac , 100 % ACN
28 - 30 min:		100 % NH_4Ac (zur Regeneration der Säule)

Die Laufgeschwindigkeit des Laufmittels betrug $1,3 \text{ mL min}^{-1}$. Die Konzentrationen des Substrates MU und der Produkte MUG und MUS wurden mit Hilfe von Eichreihen mit Konzentrationen von jeweils 2, 5, 10, 20, 30, 40 und $50 \mu\text{M}$ bestimmt.

Die ungefähren Retentionszeiten betrugen:

Methylumbelliferon-7-Glucuronid:	10,3 min
Methylumbelliferon-7-Sulfat:	11,7 min
Methylumbelliferon:	13,8 min.

4 Charakterisierung der Kultivierungssysteme

4.1 Aufbau der Bioreaktoren

4.1.1 Quadrox

Der Quadrox ist ein Hohlfiber Membran Oxygenator der Fa. Jostra. Er wurde für den Einsatz in der Klinik entwickelt, wo er in Verbindung mit der Herz-Lungen-Maschine angewandt wird, um Blut mit Sauerstoff aufzusättigen und Kohlendioxid abzuscheiden.

Der Quadrox hat eine Größe von 6 cm x 13,5 cm x 13,5 cm und besteht im wesentlichen aus zwei Membranpaketen. In der ersten Kammer des Quadrox sind Hohlfasern des Wärmetauschers (Polyethylen) und Oxygenierungsfasern in Matten kreuzweise angeordnet (s. Abb. 4-1). In der zweiten Kammer sind ausschließlich Matten aus Oxygenierungsfasern enthalten. Die Oxygenierungsfasern der untersuchten Quadroxen bestanden entweder aus Polypropylen (PP) mit einer Porengröße von weniger als 0,2 μm oder aus Polymethylpenten (PMP), das keine Poren enthält.

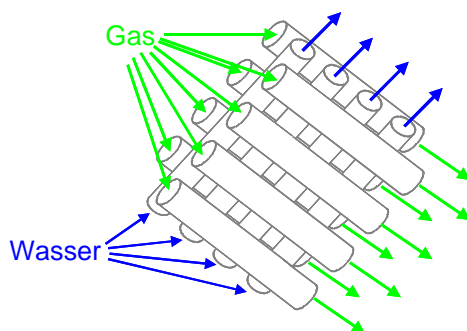


Abb. 4-1: Anordnung der Hohlfasermatten. Die Hohlfasermatten für die Begasung und die Temperierung sind kreuzweise angeordnet.

Die Oxygenierungsfasern haben einen Innendurchmesser von 280 μm bei einer Wandstärke von 50 μm . Der Abstand zwischen den Hohlfasern einer Matte und zwischen den Hohlfasermatten beträgt 200 μm . Die Hohlfasern haben eine Gesamtoberfläche von 2,4 m^2 , wobei die Oberfläche der Oxygenierungsfasern 1,8 m^2 beträgt.

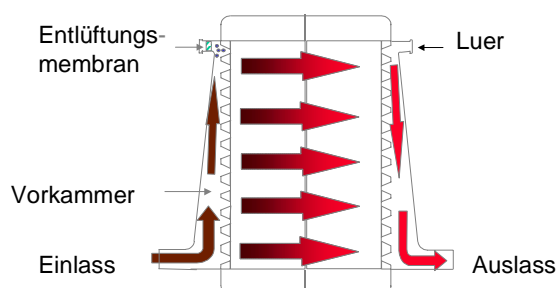


Abb. 4-2: Aufbau des Quadrox.

Der prinzipielle Aufbau des Quadrox ist in Abb. 4-2 dargestellt. Das Medium gelangt über den Einlass in eine Vorkammer des Quadrox. Dann strömt es im extrakapillaren Raum senkrecht zu den Hohlfasern Richtung Auslass (s. Abb. 4-3). In der ersten Kammer wird es oxygeniert und temperiert, in der zweiten Kammer nur oxygeniert.

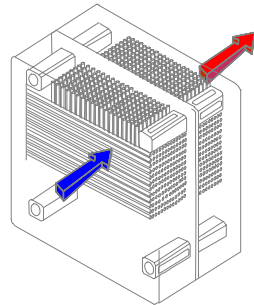


Abb. 4-3: Mediumfluss im Quadrox. Das Medium strömt senkrecht zu den kreuzweise übereinander liegenden Hohlfasermatten durch den Quadrox.

Bei der Kultivierung von Zellen werden diese in den extrakapillaren Raum gegeben. Dort adhärieren sie an und zwischen den Hohlfasern (s. Abb. 4-4). Idealerweise bilden die Zellen einen Monolayer auf den Membranen, wo sie optimal mit Sauerstoff aus den Hohlfasern und Medium aus dem extrakapillaren Raum versorgt werden können.

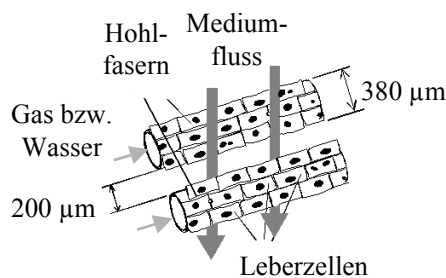


Abb. 4-4: Schematische Darstellung der Zellen im Quadrox.

4.1.2 Oxy-HFB

Mit den Erfahrungen der Kultivierung von Leberzellen im Quadrox wurde der Oxy-HFB entwickelt. Für den Labormaßstab wurde das Volumen reduziert, auf eine Temperierungseinheit verzichtet und die Bauform an die Strömungsbedingungen angepasst.

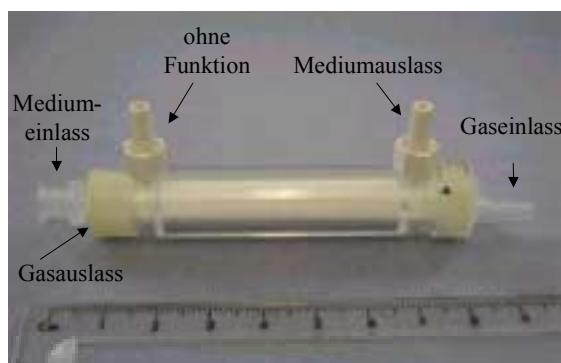


Abb. 4-5: Oxy-HFB. Auf der linken Seite ist der Medium-einlass, der unter Kultivierungsbedingungen nach unten zeigt. Oben rechts befindet sich der Mediumauslass. Das Gas strömt von rechts nach links durch die Hohlfasern (unter Kultivierungsbedingungen von oben nach unten).

In Abb. 4-5 wird der Oxy-HFB gezeigt. Er ist 7,2 cm lang und hat einen Durchmesser von 1,5 cm. Das extrakapillare Volumen beträgt 2,5 mL mit einer Oxygenierungsfläche von ungefähr 150 cm². Der Oxy-HFB besteht aus einer aufgewickelten Hohlfasermatte, die im Zentrum einen Hohlraum enthält (s. Abb. 4-6). Das Medium fließt durch den Einlass am unteren Ende des Oxy-HFB in diesen Hohlraum und gelangt dann durch den extrakapillaren Raum der aufgerollten Hohlfasermatte zum Auslass am oberen Ende des Reaktors. Die Hohlfasermatte ist identisch mit denen, die im Quadrox verwendet werden und besteht entweder aus PMP oder aus PP.

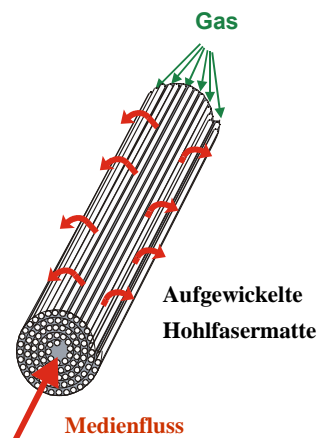


Abb. 4-6: Prinzip des Oxy-HFB. Das Medium strömt durch einen Hohlraum im Inneren der Hohlfasermatte radial nach außen und nach oben. Die Begasung erfolgt entgegengesetzt von oben nach unten durch die Hohlfasern.

Die Zellen wurden wie beim Quadrox in den extrakapillaren Raum gegeben (s. Abb. 4-7). Im Unterschied zum Quadrox werden die Hohlfasern nicht nur senkrecht, sondern hauptsächlich parallel vom Medium angeströmt.

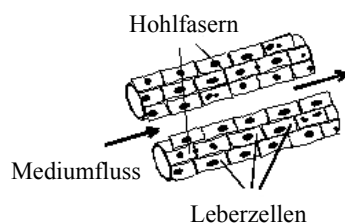


Abb. 4-7: Schematische Darstellung der Zellen im Oxy-HFB.

4.2 Verweilzeitverteilung

4.2.1 Theoretischer Hintergrund

Kultivierungen von Zellen werden wie andere chemische Prozesse entweder in kontinuierlich, halbkontinuierlich oder batchweise arbeitenden Reaktoren durchgeführt. Bei der Batch-Kultivierung wird das Kultivierungsmedium zu einem bestimmten Zeitpunkt in den Reaktor eingefüllt, nach Abschluss der Kultivierung entnommen und aufgearbeitet. Das gesamte

Medium unterliegt also der gleichen Reaktionsdauer. In der halbkontinuierlichen Kultivierung wird mit einem geringen Mediumvolumen gestartet und später kontinuierlich frisches Medium zugeführt. Der kontinuierliche Betrieb ist dadurch gekennzeichnet, dass ständig ein konstanter Mediumstrom in den Reaktor eingespeist und ein adäquater Produktstrom abgeführt wird, so dass stationäre Bedingungen gewährleistet sind. Die Aufenthaltsdauer der einzelnen Teile unterscheidet sich häufig sehr stark.

Zur allgemeinen Charakterisierung der Aufenthaltsdauer in kontinuierlich arbeitenden Reaktoren dient die mittlere Verweilzeit τ als Quotient aus Reaktorvolumen V_R und Volumenstrom F_R

$$\tau = \frac{V_R}{F_R}. \quad (1)$$

Diese gibt den Mittelwert der Verweilzeit aller Teilchen an, sagt aber über die Streuung der effektiven Verweilzeit der einzelnen Teilchen nichts aus. Die effektiven Verweilzeiten der einzelnen Teilchen, die gleichzeitig in den Reaktor eingespeist wurden, sind aufgrund von Vermischungseffekten (hydrodynamische Strömungseffekte, Diffusion) über ein mehr oder weniger breites Zeitspektrum verteilt. Bei kontinuierlicher Prozessführung sind zwei Grenzfälle, die als ideale Strömungsverhältnisse bezeichnet werden, denkbar:

- eine vollkommene Vermischung der Reaktionsmasse im Reaktor (idealer Rührkesselreaktor, continuous stirred-tank reactor, CSTR) und
- ein Durchströmen des Reaktors ohne axiale Vermischungseffekte (idealer Strömungsrohrreaktor, plug flow reactor, PFR).

Für diese idealen Reaktortypen lassen sich die Verweilzeitverteilungen theoretisch herleiten. Reale Reaktoren zeigen aufgrund von ungenügender Durchmischung, durch Totvolumina, „Kurzschlüsse“ sowie Dispersionseffekte oft starke Abweichungen vom idealen Verhalten.

Verweilzeitverteilung:

Gibt man eine bestimmte Menge eines Spurstoffs in den zu untersuchenden Reaktor, so kann man am Ausgang des Reaktors die Konzentration des Spurstoffs in Abhängigkeit von der Zeit messen. Die relative Häufigkeit aller Moleküle gleicher effektiver Verweilzeit, dargestellt als Funktion der Zeit, wird als Verweilzeitverteilung bezeichnet.

Man unterscheidet die Verteilungsdichtefunktion $E(t)$ (Impulsantwort) und die Verweilzeitsummenfunktion $F(t)$ (Sprungantwort), wobei Θ die auf die mittlere Verweilzeit bezogene aktuelle Zeit darstellt:

$$\Theta = \frac{t}{\tau} = t \cdot \frac{F_R}{V_R} . \quad (2)$$

Impulsantwort:

Die Verteilungsdichtefunktion $E(t)$ gibt den Bruchteil der ursprünglich bei $t=0$ eingebrachten Spurstoffmenge an, der die Prozesseinheit zwischen den Zeiten t und $t+dt$ verlässt. $E(t)$ ist die Antwort eines Fließsystems auf die Dirac-Stoßfunktion $\delta(t)$. Ein Dirac-Stoß wird dadurch erzeugt, dass einmalig zur Zeit $t=0$ eine bestimmte Spurstoffmenge in die Strömung eingebracht wird. Die Impulsantworten $E(t)$ für die idealen Reaktoren PFR und CSTR sind in Abb. 4-8 dargestellt.

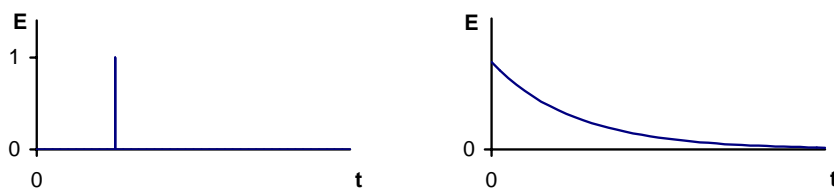


Abb. 4-8: Impulsantwort $E(t)$ des PFR (Plug Flow Reactor, links) und CSTR (Continuous Stirred-Flow Reactor, rechts).

Für die Impulsantwort $E(t)$ gilt

$$E(t) = \frac{c(t)}{\int_0^\infty c \, dt} . \quad (3)$$

Für äquidistante Messungen ist:

$$\int_0^\infty c \, dt \approx \Delta t \cdot \sum_i c_i . \quad (4)$$

Die mittlere Verweilzeit τ kann aus der Verweilzeitverteilung wie folgt berechnet werden:

$$\tau = \Delta t \cdot \sum_i t_i \cdot E_i . \quad (5)$$

Für den Vergleich verschiedener Reaktoren und verschiedener Strömungsbedingungen ist eine dimensionslose Darstellung vorteilhaft. Die dimensionslose Verteilungsdichtefunktion $E(\Theta)$ wird gegen Θ aufgetragen. $E(\Theta)$ berechnet sich nach:

$$E(\Theta) = \tau \cdot E(t) . \quad (6)$$

Wichtig ist insbesondere ein zweiter Parameter, der berechnet werden kann. Es ist ein Maß für die Streuung um den Mittelwert und wird als Varianz σ^2 bezeichnet. Im Falle einer diskreten Verteilung ist

$$\sigma^2 = \sum_i t_i^2 \cdot E_i \cdot \Delta t - \tau^2 . \quad (7)$$

Mit Hilfe der experimentell bestimmten Werte lassen sich reale Reaktoren bezüglich des Verweilzeitverhaltens charakterisieren. Dabei gilt für die idealen Reaktoren:

$$\sigma_{\Theta}^2(CSTR) = 1 \quad \text{und} \quad \sigma_{\Theta}^2(PFR) = 0 ,$$

wobei σ_{Θ}^2 die auf Θ (siehe Gl. 2) bezogene Varianz darstellt. Es gilt:

$$\sigma_{\Theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\tau^2} . \quad (8)$$

Sprungantwort:

Eine andere Testfunktion ist die Sprungfunktion $U(t)$. Dabei wird der Spurstoff ab $t = 0$ stetig in die Strömung am Reaktoreingang eingespeist. Die Antwort ergibt die Verweilzeitsummenfunktion $F(t)$, die dem Integral über $E(t)$ entspricht:

$$F(t) = \int_0^{\infty} E(t) \, dt . \quad (9)$$

$F(t)$ wird häufig auch als Übergangsfunktion bezeichnet, da sie das Verhältnis von Eingangs- zu Ausgangsgrößen darstellt und den Übergang in einen neuen stationären Zustand beschreibt. In Abb. 4-9 sind die Sprungantworten für den PFR und den CSTR dargestellt.

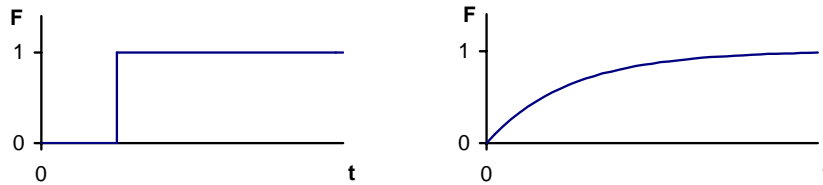


Abb. 4-9: Sprungantwort $F(t)$ des PFR (Plug Flow Reactor, links) und CSTR (Continuous Stirred-Flow Reactor, rechts).

4.2.2 Versuchsdurchführung

Mittels eines Dirac-Stoßes und einer Sprungfunktion wurden die Verteilungsdichtefunktion $E(t)$ und die Verweilzeitsummenfunktion $F(t)$ unter Variation der Strömungsgeschwindigkeit aufgenommen. Dazu wurde ein vorgegebener Volumenstrom Wasser mit dem Farbstoff Pyronin G markiert. Am Ausgang des Reaktors wurden Proben genommen, die photometrisch bei 550 nm erfasst wurden.

Sprungfunktion:

Zur Aufnahme der Sprungantwort wurde folgendem Konzentrationsprofil am Reaktoreingang gefolgt:

$\Theta < 0$	$0 \mu\text{g mL}^{-1}$	Pyronin G
$0 \leq \Theta < 2$	$1000 \mu\text{g mL}^{-1}$	Pyronin G
$2 \leq \Theta < 6$	$0 \mu\text{g mL}^{-1}$	Pyronin G

Dirac-Stoß (Impulsfunktion):

Die Impulsantwort wurde ermittelt, indem zum Zeitpunkt $t = \Theta = 0$ für die Zeitdauer von $\Delta\Theta = 0,05$ ein Spurstoffstoß mit der Pyronin G-Konzentration von $10\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ in den Reaktoreingang gegeben wurde.

Die untersuchten Strömungsgeschwindigkeiten betrugen beim Quadrox 130 und 260 mL h⁻¹ und beim Oxy-HFB 7,5, 15 und 60 mL h⁻¹. Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt.

Bestimmung der Pyronin G-Konzentration:

Die Bestimmung wurde in 96 well-Platten durchgeführt. Die Konzentrationen wurden mittels einer Eichgerade aus Standards mit den Konzentrationen 0, 10, 50, 100, 300, 500, 800 und 1000 µg mL⁻¹ ermittelt. Es wurden jeweils 60 µL Standard bzw. Probe je well aufgegeben. Die Messungen erfolgten bei 550 nm im ELISA-Reader.

4.2.3 Ergebnisse

Sprungantwort:

Zuerst wurde die Sprungantwort des Quadrox bei 130 mL h⁻¹ und 260 mL h⁻¹ aufgenommen. Der visuelle Eindruck der Sprungantwort bei 130 mL h⁻¹ ist in Abb. 4-10 gezeigt. Die obere Bildreihe zeigt den Reaktoreingang zu verschiedenen Zeitpunkten, die untere Bildreihe stellt den Ausgang des Reaktors dar.

Der schnelle Anstieg der Farbe bis $t = 0,2 \Theta$ an der Eingangsseite weist darauf hin, dass die Strömung zunächst parallel zur ersten Hohlfasermatte verläuft, bevor sie diese dann durchströmt. Bis auch das obere Drittel der Hohlfasermatte vollständig angeströmt wird, vergehen weitere 0,5 – 0,8 Θ . Bei $t = 0,7 \Theta$, also etwa zur selben Zeit wie sich das obere Drittel auf der Eingangsseite verfärbt, erreicht der Spurstoff auch die Ausgangsseite. Es dauert aber sehr lange ($t = 4,5 \Theta$), bis auch diese komplett verfärbt ist.

Die Sprungantwort des Oxy-HFB wurde mit den drei Strömungsgeschwindigkeiten 7,5, 15 und 60 mL h⁻¹ durchgeführt. Der visuelle Eindruck einer Sprungantwort im Oxy-HFB ist in der Bilderfolge von Abb. 4-11 festgehalten. Die Spurstoffpartikel gelangen durch den Eingang am unteren Teil des Oxy-HFB durch den Hohlraum im Zentrum des Reaktors in das Innere und verteilen sich von dort aus radial nach außen. So dauert es bis $t \approx 0,2 \Theta$, ehe die ersten Spurstoffpartikel im Oxy-HFB sichtbar werden. Bis zum Zeitpunkt $t = \Theta$ kann lediglich eine Intensivierung der Farbe beobachtet werden.

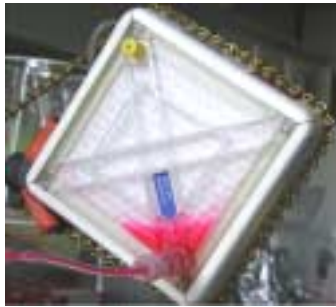
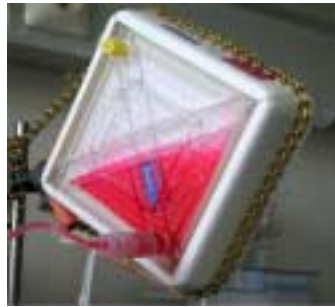
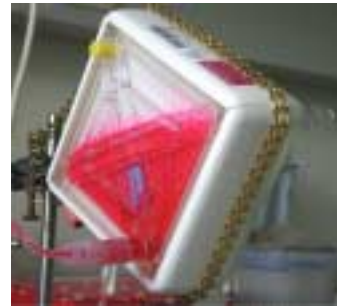
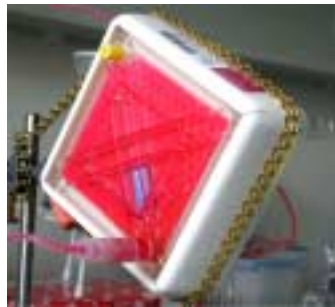
Eingang:0,05 Θ 0,1 Θ 0,2 Θ 0,7 Θ 1,5 Θ Ausgang:0,7 Θ 1,5 Θ 1,8 Θ 3,6 Θ 4,5 Θ

Abb. 4-10: Verhalten des Quadrox auf einen Sprung von Wasser auf Pyronin G-Lösung bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 130 mL h^{-1} zu verschiedenen Zeitpunkten am Eingang (obere Reihe) und am Ausgang (untere Reihe).

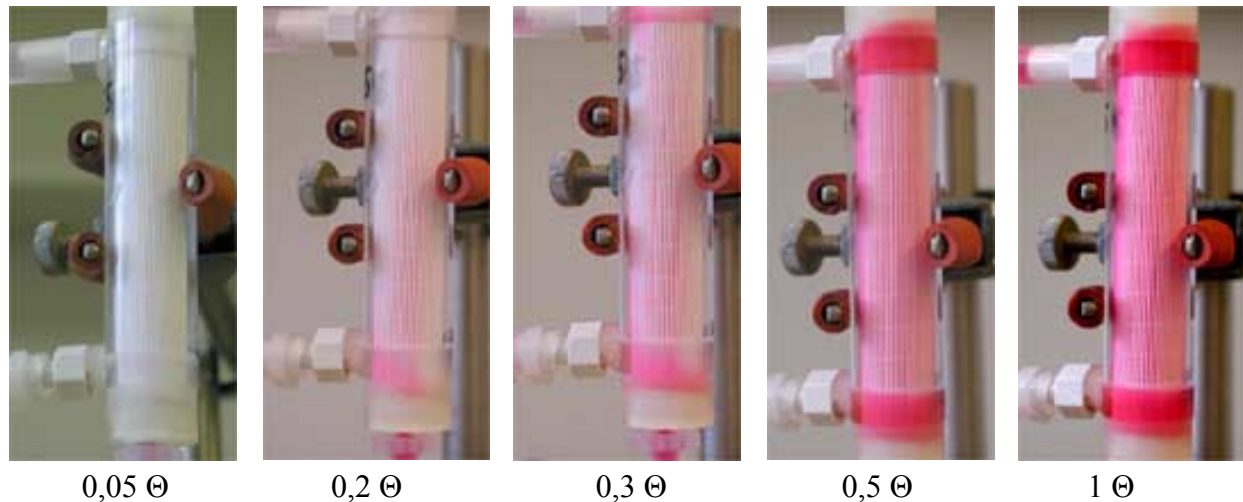


Abb. 4-11: Verhalten des Oxy-HFB auf einen Sprung von Wasser auf Pyronin G-Lösung bei einer Strömungsgeschwindigkeit von $7,5 \text{ mL h}^{-1}$ zu verschiedenen Zeitpunkten.

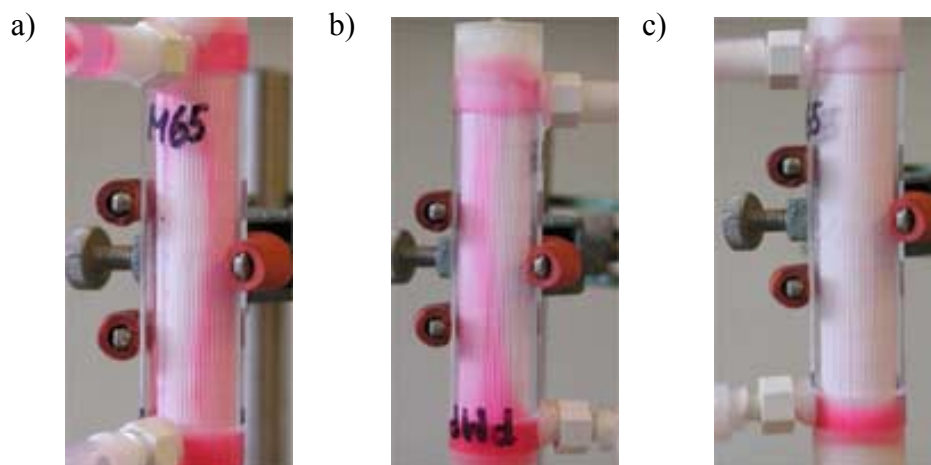


Abb. 4-12: Verhalten des Oxy-HFB auf einen Sprung von einer Pyronin G-Lösung auf Wasser bei einer Strömungsgeschwindigkeit von $7,5 \text{ mL h}^{-1}$. a) und b) „Channelling“, c) Totraum.

Wird der Sprung wieder zurück von Spurstofflösung auf Wasser durchgeführt, können einige interessante Details beobachtet werden, die in Abb. 4-12 festgehalten wurden. Abb. 4-12a zeigt kurz nach dem Umschalten von Spurstofflösung auf Wasser ein „Channelling“ des Wassers. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde an der Rückseite des Reaktors eine durch dieses „Channelling“ entstandene „Farbinsel“ gefunden (Abb. 4-12b). Abb. 4-12c stellt die Situation bei $t \approx 5 \Theta$ dar: Es ist klar zu erkennen, dass sich in der Nähe des Eingangsbereichs (unten) ein Totraum ausgebildet hat.

In Abb. 4-13 sind die Sprungantworten vom Quadrox und vom Oxy-HFB bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten gezeigt. Dabei ist die Verteilungssummenfunktion $F(\Theta)$ gegen

Θ aufgetragen. Prinzipiell unterscheiden sich diese kaum. Beim Quadrox können nach $t = 0,5 \Theta$ und beim Oxy-HFB nach $0,5 \Theta$ bzw. $0,3 \Theta$ bei $7,5 \text{ mL h}^{-1}$ bzw. 60 mL h^{-1} erste Spurstoffpartikel im Ausgang detektiert werden. Das Fließgleichgewicht wird beim Quadrox bereits nach $t = 1,4 \Theta$ erreicht, während es sich beim Oxy-HFB erst nach $1,7 \Theta$ bzw. $1,9 \Theta$ bei einer Strömungsgeschwindigkeit von $7,5 \text{ mL h}^{-1}$ bzw. 60 mL h^{-1} einstellt.

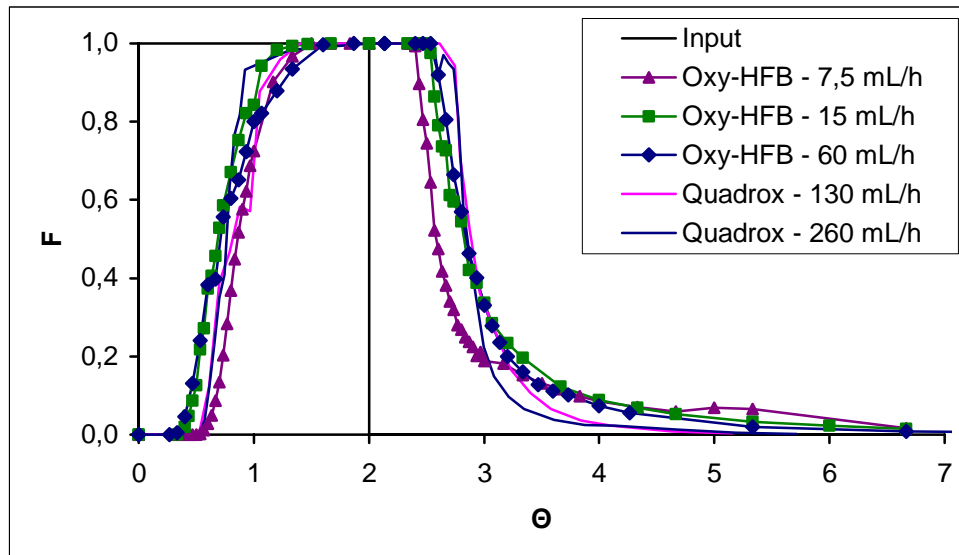


Abb. 4-13: Vergleich der Sprungantworten von Quadrox und Oxy-HFB bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten.

Bei $t = 2 \Theta$ wird anstelle der Spurstofflösung Wasser in den Eingang gegeben. Wie bereits beim Sprung von Wasser auf Spurstoff reagiert der Quadrox ($t = 2,6 \Theta$) auch auf den Sprung von Spurstoff auf Wasser etwas langsamer als der Oxy-HFB ($t = 2,5 \Theta$). Während beim Quadrox die Spurstoffkonzentration bis spätestens $t = 5 \Theta$ unter 1 % der Ausgangskonzentration sinkt, wird diese Konzentration beim Oxy-HFB erst bei etwa $t = 7 \Theta$ erreicht (außerhalb des Graphen).

Impulsantwort:

In Abb. 4-14 sind die Impulsantworten des Quadrox und des Oxy-HFB auf einen Spurstoffstoß bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten dargestellt. Dazu wurde die Verteilungsdichtefunktion $E(\Theta)$ gegen Θ aufgetragen.

Die ersten Spurstoffpartikel können beim Quadrox bei $t = 0,4 \Theta$ und beim Oxy-HFB bei $t = 0,4$ bis $0,5 \Theta$ gefunden werden. Das Maximum liegt beim Quadrox bei $t = 0,8 \Theta$ und beim Oxy-HFB zwischen $0,7$ und $0,9 \Theta$, wobei die höchste Strömungsgeschwindigkeit zu einem vorgezogenen Maximum führt.

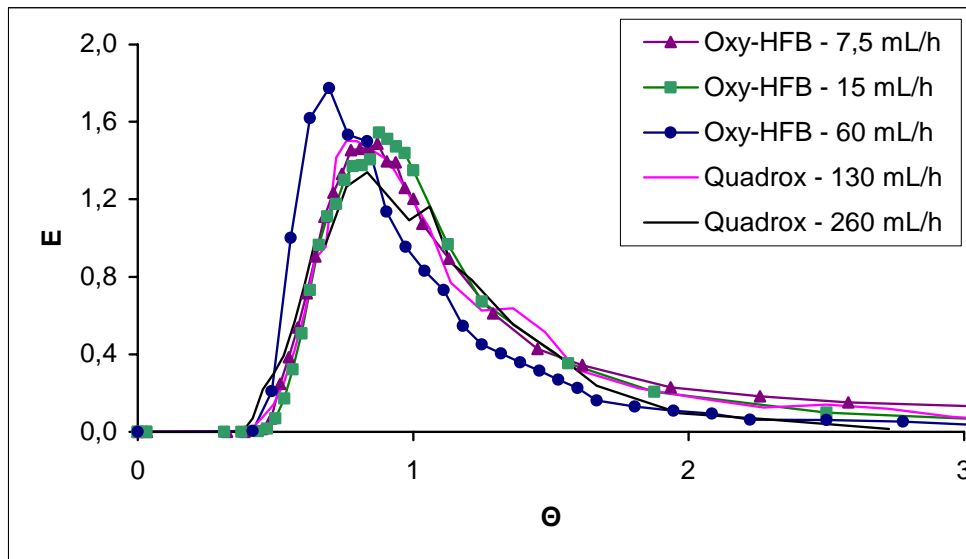


Abb. 4-14: Vergleich der Impulsantworten von Quadrox und Oxy-HFB bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten.

In Tab. 4-1 sind die aus der Impulsantwort berechneten Werte τ , σ und σ_Θ^2 aufgeführt. Die mittlere Verweilzeit τ wurde nach Gl. (1) und nach Gl. (5) bestimmt. τ (Gl.1), ermittelt aus dem Volumen von Bioreaktors und Peripherie und der Strömungsgeschwindigkeit, dient zur Kontrolle der berechneten Werte aus der Impulsantwort. Die Standardabweichung ergibt sich aus der Wurzel der Varianz nach Gl. (7).

Für eine Strömungsgeschwindigkeit von 130 mL h^{-1} ergibt sich für den Quadrox eine Verweilzeit von $(131,7 \pm 44,4) \text{ min}$. Eine Strömungsgeschwindigkeit von 260 mL h^{-1} führt zu einer Verweilzeit von $(65,7 \pm 23,4) \text{ min}$. Damit stimmen die berechneten mittleren Verweilzeiten gut mit den experimentell bestimmten überein. σ_Θ^2 beträgt für eine Strömungsgeschwindigkeit von 130 mL h^{-1} 0,11 und für 260 mL h^{-1} 0,13.

Da im Oxy-HFB das Volumen der Peripherie von 1,25 mL im Verhältnis zu den 2,5 mL Reaktorvolumen nicht zu vernachlässigen war, wurde zusätzlich die Verteilungsdichtefunktion $F(\Theta)$ gegen Θ der Peripherie ohne Oxy-HFB aufgenommen.

Für eine Strömungsgeschwindigkeit von $7,5 \text{ mL h}^{-1}$ ergibt sich beim Oxy-HFB eine mittlere Verweilzeit von $(31,4 \pm 10,6) \text{ min}$, für 15 mL h^{-1} ergibt sich $(16,3 \pm 5,4) \text{ min}$ und für 60 mL h^{-1} ergibt sich $(3,6 \pm 1,7) \text{ min}$. Damit stimmen die berechneten mittleren Verweilzeiten gut mit den experimentell bestimmten überein.

Das σ_Θ^2 ergibt sich für eine Strömungsgeschwindigkeit von $7,5 \text{ mL h}^{-1}$ und 15 mL h^{-1} zu 0,11 und für 60 mL h^{-1} zu 0,21. Bei der Peripherie ist das σ_Θ^2 bei $7,5 \text{ mL h}^{-1}$ 0,14, bei 15 mL h^{-1} 0,16 und bei 60 mL h^{-1} 0,15.

Tab. 4-1: Berechnete Werte aus der Impulsantwort bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten für das Gesamtsystem Reaktor und Peripherie.

Quadrox	τ (Gl. 1) [min]*	τ (Gl. 5) [min]	σ (Gl. 7) [min]	σ_{Θ}^2 (Gl. 8) [-]
130 mL h ⁻¹	131,8	131,7	44,4	0,11
260 mL h ⁻¹	65,9	65,7	23,4	0,13

* $V_R = 250$ mL, $V_{\text{Peripherie}} = 40$ mL

Oxy-HFB	τ (Gl. 1) [min]*	τ (Gl. 5) [min]	σ (Gl. 7) [min]	σ_{Θ}^2 (Gl. 8) [-]
7,5 mL h ⁻¹	30,0	31,4	10,6	0,11
nur Peripherie	10,0	10,0	3,8	0,14
15 mL h ⁻¹	15,0	16,3	5,4	0,11
nur Peripherie	5,0	4,8	1,9	0,16
60 mL h ⁻¹	3,8	3,6	1,7	0,21
nur Peripherie	1,3	1,2	0,5	0,15

* $V_R = 2,5$ mL, $V_{\text{Peripherie}} = 1,25$ mL

4.2.4 Diskussion

Reale Reaktoren zeigen aufgrund von ungenügender Vermischung, durch Totvolumina, „Kurzschlüsse“ sowie Dispersionseffekte oft starke Abweichungen vom idealen Verhalten. Das ideale Verhalten vom Rührkesselreaktor CSTR und vom Strömungsrohrreaktor PFR stellen aber Grenzfälle des realen Verhaltens dar.

Im CSTR herrscht innerhalb der Reaktionslösung definitionsgemäß vollständige Durchmischung. Es treten keine Konzentrations- und Temperaturgradienten auf, so dass die Konzentration im Reaktor gleich der Ausgangskonzentration ist.

Das ideale Strömungsrohr PFR zeichnet sich dadurch aus, dass aufgrund der sehr schnellen Strömung keine Rückvermischung möglich ist. Turbulenzen können sich nur in radialer Richtung ausbilden und sind dabei derart intensiv, dass in dieser Richtung keine Konzentrations- und Temperaturgradienten auftreten. Ein solches Strömungsverhalten lässt sich bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten sowohl in einem zylindrischen Rohrreaktor als auch in einem Festbettreaktor erzielen. Da die axiale Rückvermischung ausgeschlossen ist,

wird ein am Eingang aufgebrachtes Störsignal am Reaktorausgang mit einer Zeitverzögerung von $t = \tau$ exakt reproduziert.

Mit Hilfe der experimentell bestimmten Werte aus der Verweilzeitverteilung lässt sich die auf Θ bezogene Varianz σ_{Θ}^2 bestimmen. Dieser Wert ist besonders gut geeignet, das reale Verhalten eines Reaktors einzuordnen. Dabei gilt für die idealen Reaktoren:

$$\sigma_{\Theta}^2(CSTR) = 1 \quad \text{und} \quad \sigma_{\Theta}^2(PFR) = 0.$$

In Tab. 4-2 ist eine Übersicht der berechneten σ_{Θ}^2 zu finden. Ein Vergleich der Werte von Quadrox und Oxy-HFB zeigt, dass diese sich kaum unterscheiden. σ_{Θ}^2 der Peripherie, die ja lediglich aus einem kurzen Stück Schlauch besteht, beträgt ca. 0,15 und ist damit, wie erwartet, einem idealen Strömungsrohr sehr viel ähnlicher als einem idealen Rührkesselreaktor. Aber auch die Reaktoren weisen bis auf eine Ausnahme nur ein σ_{Θ}^2 von ca. 0,11 auf und verhalten sich damit wie ein reales Strömungsrohr. Lediglich bei dem Oxy-HFB mit der höheren Strömungsgeschwindigkeit von 60 mL h^{-1} ergibt sich ein erhöhtes σ_{Θ}^2 von 0,21. Damit entfernt sich der Oxy-HFB mit steigender Strömungsgeschwindigkeit etwas vom Verhalten eines Strömungsrohrs. Die Hohlfasern im Inneren des Reaktors führen dabei zu Turbulenzen, die wiederum eine Rückvermischung zur Folge haben.

Tab. 4-2: Überblick über σ_{Θ}^2 vom Quadrox und Oxy-HFB bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten.

	Strömungs- geschwindigkeit	Bioreaktor + Peripherie σ_{Θ}^2	Peripherie σ_{Θ}^2
Quadrox	130 mL h^{-1}	0,11	—
	260 mL h^{-1}	0,13	—
Oxy-HFB	$7,5 \text{ mL h}^{-1}$	0,11	0,14
	15 mL h^{-1}	0,11	0,16
	60 mL h^{-1}	0,21	0,15

Die Sprungantworten von Quadrox und Oxy-HFB unterscheiden sich kaum (siehe Abb. 4-13). Auffällig ist bei der Konzentrationsabnahme des Spurstoffs der Unterschied zwischen Oxy-HFB und Quadrox im Bereich $t = 3 \Theta$ bis 4Θ . Während die Konzentrationsabnahme beim

Quadrox erwartungsgemäß erfolgt, setzt beim Oxy-HFB bei allen drei Strömungsgeschwindigkeiten ein „Tailing“ ein. Dieses „Tailing“ deutet auf Toträume hin, die schlecht durchströmt werden. Der offensichtlichste Totraum ist in Abb. 4-12c gezeigt. Weitere konstruktionstechnische Verbesserungen sollten diesen Totraum eliminieren können.

Obwohl in Abb. 4-13 nicht so offensichtlich, sind auch im Quadrox bei den hier getesteten Strömungsgeschwindigkeiten Toträume nachweisbar, wie auf den Fotos in Abb. 4-10 erkennbar: Die Ecke oberhalb des Reaktorausgangs ist selbst bei $t = 3,6 \Theta$ noch nicht vollständig verfärbt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist allerdings davon auszugehen, dass bei der ursprünglich vorgesehenen Strömungsgeschwindigkeit von 0,5 bis 7 L min⁻¹ für die Oxygenation von Blut dieser Totraum nicht mehr vorhanden ist. Da für die Kultivierung von adhären ten tierischen Zellen Strömungsgeschwindigkeiten in dem Bereich jedoch nicht in Frage kommen, stellt sich dieser große Totraum als nachteilig für die Kultivierung dar.

Wie bereits bei den Sprungantworten festgestellt wurde, weisen auch die Impulsantworten von Quadrox und Oxy-HFB untereinander große Ähnlichkeiten auf (siehe Abb. 4-14). Lediglich die Impulsantwort des Oxy-HFB bei der höchsten Strömungsgeschwindigkeit von 60 mL h⁻¹ zeigt ein leicht abweichendes Verhalten. Im Vergleich zu den anderen Kurven tritt ein nach vorne verschobenes Maximum auf, das auf einen geringen „Kurzschluß“-Effekt zwischen Reaktoreingang und –ausgang deuten könnte. Zusätzlich treten wegen der größeren Strömungsgeschwindigkeit aber auch leichte Verwirbelungen im Reaktor auf, die sich in dem leicht erhöhten σ_{Θ}^2 zeigen.

Für die Kultivierung von Zellen wird in der Regel das Verhalten eines Rührkesselreaktors gegenüber dem eines Strömungsrohres bevorzugt. Insbesondere schnellwachsende und somit auch schnell metabolisierende Zellen sind auf eine ständige Nährstoffversorgung im optimalen Konzentrationsbereich ohne große Konzentrationsdifferenzen angewiesen. Diese Voraussetzungen können im allgemeinen von einem schlecht durchmischten System wie dem Strömungsrohr nicht erfüllt werden.

Betrachtet man die besondere Situation adhären ter tierischer Zellen, so handelt es sich hierbei in den meisten Fällen um langsam oder gar nicht proliferierende Zellen, die somit auch nur über einen langsam ablaufenden Metabolismus verfügen. Der Nährstoff wird durch die Zellen so langsam abgebaut, dass durch die Rezirkulation des Mediums geringere Konzentrationsdifferenzen zwischen Reaktoreingang und –ausgang entstehen als in einer Batch-Kultivierung in der Petrischale zwischen Start und Ende der Inkubationszeit des Mediums. Zur Kultivierung langsam metabolisierender Zellen erscheinen die Reaktoren

hinsichtlich der Fluidodynamik geeignet, insbesondere wenn das Medium zirkuliert und extern vermischt wird. Nachteilig sind die Toträume beider Reaktortypen, die im Oxy-HFB allerdings mittels einer Reduktion des Innendurchmessers der Reaktorhülle im entsprechenden Bereich zumindest verkleinert werden können.

4.3 Mischzeit

4.3.1 Theoretischer Hintergrund

Ziel eines jeden Mischvorgangs ist es, die für den Prozess erforderliche Homogenität im gesamten Behältervolumen zu erreichen. Konzentrationsgradienten ergeben sich durch Substratzugaben, Stoffübergänge sowie Produktbildung der Zellen oder Mikroorganismen. Die Mischzeit ist definiert als die Zeit, die notwendig ist, um örtliche Konzentrationsunterschiede bis zu einem bestimmten Homogenitätsgrad abzubauen. Der Homogenitätsgrad H berechnet sich nach der Beziehung

$$H(t) = \frac{c(t) - c_0}{c_1 - c_0}, \quad (10)$$

mit der aktuellen Konzentration $c(t)$, der stationären Endkonzentration c_1 und der Ausgangskonzentration c_0 . Zur Bestimmung des Mischzeitverhaltens wird ein Spurstoff stoßförmig in den Reaktor eingebracht und die Zeit bis zur Einstellung des gewünschten Homogenitätsgrads H ermittelt.

4.3.2 Versuchsdurchführung

Die Bestimmung der Mischzeit wurde nur für den Oxy-HFB durchgeführt, da hier eine Batch-Kultivierung mit Rezirkulation vorlag. Somit sind über den Kultivierungszeitraum zwischen den Mediumwechseln Konzentrationsdifferenzen zu erwarten. Bei dem Quadrox wurde hingegen eine kontinuierliche Kulturführung gewählt, die zu einem Fließgleichgewicht führt.

Zur Bestimmung der Mischzeit wurden Oxy-HFBs mit unterschiedlichen Schlauchsystemen ausgestattet, wie sie auch in den Kultivierungen verwendet wurden (s. 3.3.3.2). Mit der Spritze wurde ein Spurstoffstoß ($10\,000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ Pyronin G, 2 % des Gesamtvolumens) in dem mit Wasser gefülltem Versuchsaufbau gegeben. Während das Wasser im Kreislauf

gepumpt wurde, erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Probenahme. Die Konzentration des Pyronin G in den Proben wurde wie in Kap. 4.2.2 beschrieben bestimmt.

Die Mischzeit ergab sich als die Zeit, die von Zugabe des Spurstoffs bis zum Erreichen des durch den Homogenitätsgrad vorgegebenen Konzentrationsbereichs verging.

4.3.3 Ergebnisse und Diskussion

In Tab. 4-3 sind die beim Oxy-HFB ermittelten Mischzeiten aufgeführt. Je größer die Strömungsgeschwindigkeit ist, desto kleiner wird die Mischzeit. So beträgt die Mischzeit bei 12,5 mL Gesamtvolumen und einer Geschwindigkeit von $7,5 \text{ mL h}^{-1}$ ungefähr 240 – 300 min ($H = 90 \%$). Eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit auf 60 mL h^{-1} verringert die Mischzeit auf 120 min. Die Vervierfachung des Gesamtvolumens von 12,5 auf 50 mL führt dagegen nicht zu einer erheblichen Steigerung der Mischzeit, sie steigt lediglich von 240 – 300 min auf 270 – 360 min.

Tab. 4-3: Ergebnisse der Mischzeitbestimmung bei einem Homogenitätsgrad von 90 % beim Oxy-HFB unter Berücksichtigung unterschiedlicher Strömungsgeschwindigkeiten und Volumina.

Strömungsgeschwindigkeit [mL h^{-1}]	Volumen [mL]	Mischzeit [min]
7,5	12,5	240 – 300
7,5	50	270 – 360
15	12,5	120
60	12,5	45

Da das System nicht auf eine optimale Durchmischung ausgerichtet wurde, waren keine kleinen Mischzeiten zu erwarten gewesen. Mischeffekte treten eher „zufällig“ durch Diffusion und kleinere Turbulenzen in der Strömung auf. Der Grund für den geringen Unterschied in der Mischzeit bei der Variation des Volumens liegt in der Auswahl der Peripherieschläuche. Bei einem Volumen von 12,5 mL kamen nur Schläuche mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm zum Einsatz. Zur Vergrößerung des Volumens wurde ein 62 cm langes Stück Schlauch mit 7 mm Innendurchmesser eingesetzt, in dem sich der Spurstoff durch Diffusion und Strömung innerhalb einer Stunde gleichmäßig verteilen konnte.

Bei den Kultivierungen von Zellen wurde das Medium alle 48 h gewechselt. Ein Vergleich mit der maximalen Mischzeit von 6 h zeigt, dass das Medium zwischen den Mediumwechseln

mehrmals vollständig durchmischt wird. Bei den durchgeführten Zellkultivierungen im Oxy-HFB führte kein Versuchsschritt zu einer Art „Spurstoffstoß“, so dass Konzentrationsdifferenzen in dem hier untersuchten Umfang nicht auftreten konnten. Somit erscheinen die Mischzeiten für die durchgeführten Versuche mit tierischen Zellen als ausreichend, Limitationen durch Konzentrationsunterschiede zu vermeiden.

4.4 Gasaustausch

4.4.1 Theoretischer Hintergrund

In der Biotechnologie wie auch in klassischen chemischen Prozessen stellt der Gaseintrag in Flüssigkeiten oft den umsatzbestimmenden Faktor dar. Die meisten tierischen Zellen benötigen ebenso wie viele Mikroorganismen Sauerstoff, um ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten. Da Sauerstoff in Wasser ($289 \mu\text{mol L}^{-1}$) oder Medium schlecht löslich ist, muss er laufend zugeführt werden.

Klassischerweise werden für Anwendungen, die viel Sauerstoff verbrauchen, Rührkesselreaktoren eingesetzt, bei denen sauerstoffhaltiges Gas direkt in die Flüssigkeit geleitet und mit einem Rührer dispergiert wird. Kultivierte tierische Zellen haben jedoch nicht mehr den Schutz des sie normalerweise umgebenden Gewebes und besitzen auch keine robusten Zellwände wie Bakterien. Träger-immobilisierte Zellen sind zwar besser gegen mechanische Einflüsse geschützt, verursachen aber andere Probleme wie z. B. die Aufrechterhaltung des Stofftransportes.

Frei aufsteigende Blasen erzeugen in ihrer Wirbelschlepe und besonders bei ihrer Eruption an der Flüssigkeitsoberfläche hohe lokale Scherkräfte, welche die Zellen einem Stress aussetzen und sie so beschädigen oder sogar zerreißen (Garcia-Briones et al 1994).

Für adhärente tierische Zellen ist die diffusive Begasung über eine Membran ideal, auf der sie direkt kultiviert werden können (Gerlach et al 1990). Der Sauerstofftransport erfolgt dabei direkt aus der Gasphase durch die Membran in die Zellen. Ein „Umweg“ des Sauerstofftransports durch die Flüssigphase wie beim Rührkesselreaktor ist dabei nicht erforderlich. Somit ist der Sauerstofftransport lediglich von der Permeabilität der Membran und der Konzentrationsdifferenz abhängig.

Die Sauerstoffkonzentration $c_{O_2}^*$ ist vom Sauerstoffpartialdruck p_{O_2} und der Henrykonstante H_{O_2} abhängig:

$$c_{O_2}^*(t) = \frac{p_{O_2}(t)}{H_{O_2}}. \quad (11)$$

Vereinfachend wird häufig der relative Sauerstoffpartialdruck pO_2 angegeben,

$$pO_2(t) = \frac{p_{O_2}(t)}{p_{O_2,cal}}, \quad (12)$$

der sich auf die Kalibrierbedingungen bezieht und direkt proportional zur Sauerstoffkonzentration $c_{O_2}^*$ ist (Bailey und Ollis 1986).

Der volumenbezogene Stoffstrom zwischen Gas- und Flüssigphase,

$$OTR(t) = k_L a \cdot (c_{O_2}^*(t) - c_{O_2}(t)), \quad (13)$$

wird mit Sauerstofftransportrate OTR (oxygen transfer rate) bezeichnet und ist direkt proportional zum volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten $k_L a$ und der O_2 -Konzentrationsdifferenz zwischen der Gleichgewichtskonzentration $c_{O_2}^*$ und der aktuellen Konzentration c_{O_2} . Sie wird durch das treibende Konzentrationsgefälle zwischen Gas- und Flüssigphase verursacht und ist bei Sauerstofftransport von der Flüssig- in die Gasphase mit einem negativen Vorzeichen behaftet.

Der volumetrische Stoffübergangskoeffizient $k_L a$ wird in der Regel experimentell bestimmt, da er nur mit großem Aufwand berechnet werden kann und von verschiedenen Parametern wie der Reaktorbauweise und den Strömungsverhältnissen abhängt. Es gibt diverse Methoden zur experimentellen Bestimmung des $k_L a$ -Wertes, die der Literatur entnommen werden können (z.B. Moser 1981).

4.4.2 Versuchsdurchführung

Zur Abschätzung der Oxygenierungsfähigkeit eines Reaktors werden sowohl Sauerstoffentladungskurven bei Begasung des sauerstoffgesättigten Reaktors mit reinem Stickstoff als auch Sauerstoffaufladungskurven bei Begasung des sauerstofffreien Reaktors mit Luft aufgenommen. Dazu wurde aus einer mit Stickstoff- bzw. Luft-begasten Vorratsflasche

Wasser bei Raumtemperatur durch den Reaktor gepumpt. Druckluft bzw. Stickstoff wurde durch ein Rotameter geführt, auf die gewünschte Begasungsrate eingestellt und in den Gaseingang des Reaktors geleitet.

Die Sauerstoffkonzentrationen wurden mit einem faseroptischen Sauerstoffsensor (MOPS 4) gemessen. Die Messsonde besteht aus einem Glasfaserkabel mit einem Durchmesser von ca. 1 mm, auf dessen Spitze ein sauerstoffsensitiver Fluoreszenzfarbstoff aufgebracht wurde. Die Sauerstoffsonden wurden vor dem Versuch kalibriert und nach jeder Messreihe überprüft. Die Kalibration wurde in einer gesättigten alkalischen Ascorbinsäure-Lösung (ca. 330 mg mL⁻¹, pH 11) für den Nullpunkt und mit Luft für den Sauerstoffpartialdruck $pO_2 = 100\%$ durchgeführt.

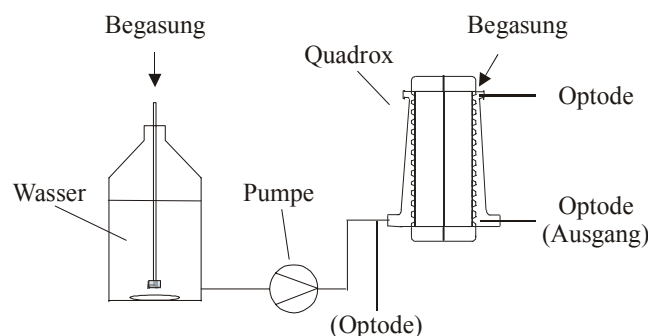


Abb. 4-15: Versuchsaufbau zur Bestimmung des Sauerstoffeintrags beim Quadrox. Eine Optode war optional vorm Reaktoreingang positioniert. Die anderen beiden Optoden waren in der Nähe des Begasungseingangs und im Reaktorausgang platziert. Das Wasser wurde in der Vorratsflasche auf einem Magnetrührer gerührt und mit Stickstoff bzw. Luft begast. Die Schläuche zwischen der Vorratsflasche und dem Quadrox wurden so kurz wie möglich gehalten und bestanden aus Tygon, um eine vorzeitige Oxygenierung aus der Umgebung zu reduzieren.

Die Messstellen und der Versuchsaufbau sind für den Quadrox in Abb. 4-15 und für den Oxy-HFB in Abb. 4-16 dargestellt. Sowohl beim Quadrox als auch beim Oxy-HFB wurden die Oxygenierungsversuche mit Hohlfasern aus PMP durchgeführt. Dem Informationsmaterial der Fa. Jostra kann entnommen werden, dass die Oxygenierungseigenschaften von PMP-Fasern dem von PP-Fasern entspricht (beide weisen einen Sauerstoffeintrag von 420 mL min⁻¹ bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 7 L min⁻¹ auf). Deshalb wurde darauf verzichtet, die Messungen mit PP-Fasern zu wiederholen.

Es wurden verschiedene Strömungsgeschwindigkeiten getestet: einerseits die in den Kultivierungen eingesetzten (7,5, 15 und 60 mL h⁻¹) und andererseits eine deutlich höhere Strömungsgeschwindigkeit von 10 mL min⁻¹ zur Abschätzung des maximal möglichen Sauerstoffeintrags. Die Versuche wurden insgesamt dreimal durchgeführt, lediglich die Sauerstoffaufladungskurven ohne Begasung wurden nur einmal aufgenommen.

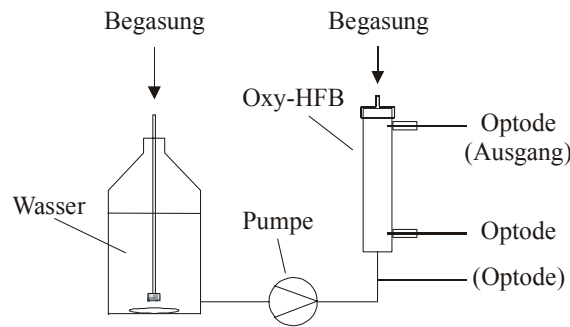


Abb. 4-16: Versuchsaufbau zur Bestimmung des Sauerstoffeintrags beim Oxy-HFB. Eine Optode war optional vor dem Reaktoreingang, die zweite kurz hinter dem Reaktoreingang und die dritte im Reaktorausgang lokalisiert. Das Wasser wurde in der Vorratsflasche auf einem Magnetrührer gerührt und mit Stickstoff bzw. Luft begast. Die Schläuche zwischen der Vorratsflasche und dem Oxy-HFB wurden so kurz wie möglich gehalten und bestanden aus Tygon, um eine vorzeitige Oxygenierung aus der Umgebung zu reduzieren.

4.4.3 Ergebnisse

4.4.3.1 Quadrox

In Abb. 4-17 ist die Sauerstoffaufladungskurve bei der Oxygenierung von zuvor mit Stickstoff begastem Wasser dargestellt. Es wurden zwei verschiedene Strömungsgeschwindigkeiten, 130 und 260 mL h⁻¹, getestet. Bei beiden Strömungsgeschwindigkeiten kann der erste Anstieg des pO_2 am Reaktorausgang nach ungefähr 6 min beobachtet werden. Innerhalb von 12 – 16 min wird eine Sättigung mit Sauerstoff am Reaktorausgang erreicht. Dabei wird die Sättigung bei der höheren Strömungsgeschwindigkeit von 260 mL h⁻¹ ca. 5 min früher erreicht.

Ein ähnliches Verhalten zeigt sich bei der Desoxygenierung von mit Luft-angereichertem Wasser. Eine Begasung des Reaktors ist für die Oxygenierung unbedingt erforderlich, wie ein Versuch ohne Begasung zeigt, bei dem sich der pO_2 nach 25 min zwischen 10 und 20 % am Reaktorausgang einstellte. Ein Anstieg der Strömungsgeschwindigkeit verbessert den Sauerstoffübergang geringfügig. Sauerstoffmessungen vor dem Quadrox ergaben bei allen Versuchsbedingungen einen pO_2 von 0 % bzw. 100 %. Die Messungen am Begasungseingang führten zu nicht verwertbaren Ergebnissen und werden hier deshalb nicht dargestellt.

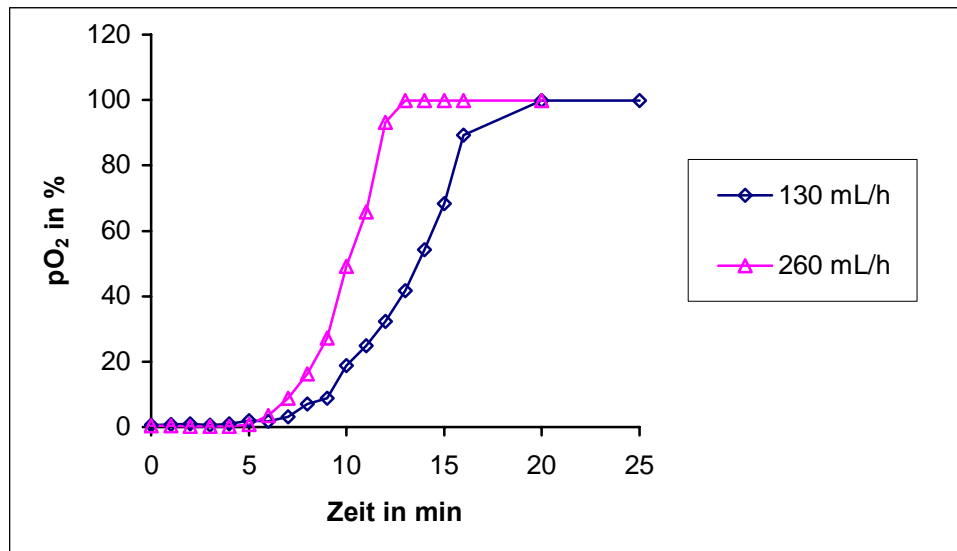


Abb. 4-17: Sauerstoffaufladungskurve des Quadrox bei Begasung mit Luft unter Variation der Strömungsgeschwindigkeit bei einer Begasungsrate von 15 mL min^{-1} . Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 wurde im Reaktorausgang gemessen.

4.4.3.2 Oxy-HFB

In Abb. 4-18 ist das Sauerstoffaufladungsverhalten im Oxy-HFB bei der Oxygenierung von mit N_2 -begastem Wasser dargestellt. Die Begasungsrate betrug 5 mL min^{-1} und die Strömungsgeschwindigkeit 7,5, 15 und 60 mL h^{-1} .

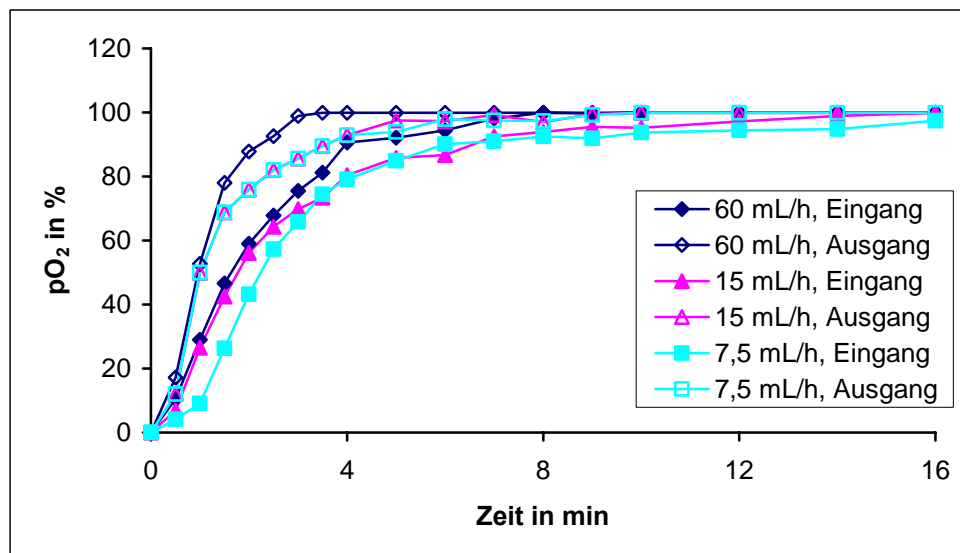


Abb. 4-18: Sauerstoffaufladungskurve des Oxy-HFB bei Begasung mit Luft unter Variation der Strömungsgeschwindigkeit bei einer Begasungsrate von 5 mL min^{-1} . Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 wurde jeweils kurz hinter dem Reaktoreingang und im Reaktorausgang gemessen.

Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 stieg unter allen Strömungsbedingungen innerhalb der ersten 2 min an und erreichte innerhalb von 5 min am Reaktorausgang eine Sauerstoffsättigung. Das Verhalten des pO_2 ist kaum vom Ort der Messung abhängig. Selbst am Reaktoreingang wird innerhalb der Versuchszeit von 16 min beinahe eine Sättigung mit Sauerstoff erreicht. Tendenziell beschleunigt eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit sowohl am Ein- als auch am Ausgang den Anstieg des pO_2 .

In Abb. 4-19 ist die Oxygenierung von N_2 -begastem Wasser bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 10 mL min^{-1} unter Variation der Begasungsrate dargestellt. Bei der Oxygenierung wird die Sauerstoffsättigung am Reaktorausgang nach 5 min erreicht.

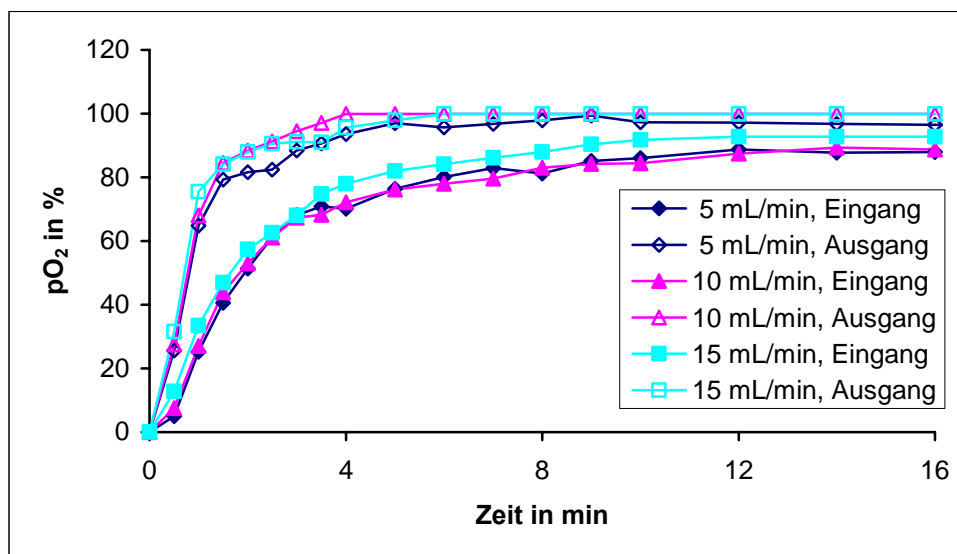


Abb. 4-19: Sauerstoffaufladungskurve des Oxy-HFB bei Begasung mit Luft unter Variation der Begasungsrate bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 10 mL min^{-1} . Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 wurde jeweils kurz hinter dem Reaktoreingang und im Reaktorausgang gemessen.

Im Gegensatz zu den vorher getesteten Strömungsgeschwindigkeiten von maximal 60 mL h^{-1} kann bei 10 mL min^{-1} keine vollständige Oxygenierung in der Nähe des Reaktoreingangs erzielt werden. Bei der Begasung mit Luft ist „lediglich“ ein Sauerstoffpartialdruck zwischen 85 und 95 % zu messen. Es ist eine geringfügig stärkere Oxygenierung mit Erhöhung der Begasungsrate zu erkennen.

In einem weiteren Versuch wurde das Sauerstoffaufladeverhalten des Oxy-HFB bei einer Durchströmung mit N_2 -begastem Wasser ohne zusätzliche Begasung untersucht. Es sind hierbei wieder Strömungsgeschwindigkeiten gewählt worden, die auch bei Kultivierungen eingesetzt wurden. Im Vergleich zu den Oxygenierungsversuchen mit Begasung steigt der pO_2 deutlich langsamer an. Dennoch kann am Reaktorausgang am Ende der Versuchsdauer

(20 min) ein pO_2 von fast 100 % gemessen werden. In der Nähe des Reaktoreingangs werden ungefähr 40 % detektiert.

Bei allen Versuchsbedingungen wurde der tatsächlich erreichte relative Sauerstoffpartialdruck pO_2 vor dem Oxy-HFB überprüft. Der pO_2 betrug bei allen Sauerstoffentladungsversuchen 100 %. Bei den Sauerstoffaufladeversuchen hing der erzielte pO_2 von der Strömungsgeschwindigkeit ab: 0 % bei 10 mL min^{-1} , 7 % bei 60 mL h^{-1} , 13 % bei 15 mL h^{-1} und 35 % bei $7,5 \text{ mL h}^{-1}$. Das Sauerstoffaufladeverhalten entspricht prinzipiell dem Sauerstoffentladeverhalten.

4.4.4 Diskussion

Die durchgeführten Experimente können nur zur groben Abschätzung der Oxygenierungsleistung der Reaktoren dienen, da viele Faktoren nicht den tatsächlichen Verhältnissen bei der Kultivierung von Zellen gerecht werden. Wie eingangs bereits erwähnt, ist für die Sauerstoffaufnahme der Zellen im Reaktor eine Oxygenierung des Mediums nicht erforderlich, da die Mehrheit der Zellen direkt auf der Membran sitzt und somit direkt aus der Gasphase mit O_2 versorgt werden kann.

Die Strömungsverhältnisse in einem „leeren“ Reaktor sind wahrscheinlich anders als die in einem mit Zellen gefüllten. Allerdings deuten die Oxygenierungsversuche nur bedingt darauf hin, dass die Strömungsgeschwindigkeit über der Hohlfaser in dem untersuchten Bereich von $7,5 \text{ mL h}^{-1}$ bis 10 mL min^{-1} (Oxy-HFB) eine bedeutende Rolle spielt.

Vielmehr scheint die Konzentrationsdifferenz zwischen Medium bzw. Wasser und der Gasphase im Inneren der Hohlfaser eine wesentliche Rolle zu spielen. Dieser Faktor kann aber nur ungenügend untersucht werden, da die Konzentrationsdifferenz bereits lange vor Erreichen der mittleren Verweilzeit im Reaktor gegen Null geht. Oxygenierungsversuche ohne externe Begasung zeigen aber, dass der Quadrox im Gegensatz zum Oxy-HFB auf eine Begasung unbedingt angewiesen ist, da die kompakte Bauform die Diffusionswege erheblich verlängert und somit auch die Konzentrationsdifferenz verringert wird (s. Gl. 12).

Wie die O_2 -Messungen vor den Reaktoren zeigen, findet ein geringer Sauerstoffaustausch aus dem Medium in der Peripherie mit der Umgebung statt. Dieser Sauerstofftransfer war aber nur bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten von $7,5$ bis 60 mL h^{-1} messbar, die beim Oxy-HFB zum Einsatz kamen. Interaktionen mit der Umgebung können nicht nur vor dem Reaktor

auftreten, sondern auch an dem unteren Optoden-Zugang, am Reaktorausgang und am Gasausgang. Berücksichtigt man dies, so ergäbe sich eine Beschleunigung bei der Sauerstoffaufladung, was experimentell nicht bestätigt wurde (siehe Abb. 4-18).

Die ursprüngliche Aufgabe des Quadrox ist die Oxygenierung von Blut. Daher war zu erwarten, dass der Quadrox hervorragende Oxygenierungseigenschaften aufweist. Die speziell entwickelten Hohlfasern aus PMP sind ebenfalls in den Oxy-HFB eingebaut. Der Hersteller des Quadrox, Fa. Jostra, gibt für den Quadrox einen maximal gemessenen Sauerstofftransfer von 420 mL min^{-1} an, der bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 7 L min^{-1} bestimmt wurde. Das entspricht einer Sauerstofftransportrate *OTR* (oxygen transfer rate) von $75 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$. Es ist jedoch davon auszugehen, dass bei einer höheren Strömungsgeschwindigkeit noch höhere Werte gemessen werden könnten. Umgekehrt kann nicht automatisch daraus geschlossen werden, dass dieselben Sauerstoffeinträge auch bei sehr viel niedrigeren Strömungsgeschwindigkeiten in Kombination mit Sauerstoffverbrauchern erreicht werden können.

Tab. 4-4: Abschätzung des Sauerstoffeintrags beim Oxy-HFB bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten.

	pO ₂ (Eingang)*	OTR (in 10 % V _R)	OTR (in 100 % V _R)	OTR
	[%]	[nmol min ⁻¹]	[μmol min ⁻¹]	[μmol min ⁻¹ mL ⁻¹]
7,5 mL h ⁻¹	100	36,1	0,36	0,14
15 mL h ⁻¹	100	72,3	0,72	0,29
60 mL h ⁻¹	100	289	2,89	1,16
10 mL min ⁻¹	85	2457	24,57	9,83

* gemessen in der Nähe des Eingangs am Ende der Versuchszeit

Eine Abschätzung des Sauerstoffeintrags in den Oxy-HFB kann unter der Annahme gemacht werden, dass die Sauerstoffsonde in der Nähe des Eingangs die Oxygenierung des Wassers nach Passieren von 10 % des Reaktorvolumens misst. Die berechneten Parameter sind in Tab. 4-4 aufgeführt. Die für die Strömungsgeschwindigkeiten von 7,5 bis 60 mL h⁻¹ ermittelten Werte stellen lediglich Minimalwerte dar, da die Konzentrationsdifferenz des Sauerstoff zwischen Gasphase im Hohlfaserinnerem und dem Wasser bereits nach Passieren von 10 % des Reaktorvolumens V_R gegen Null geht. Einen besseren Anhaltspunkt für den Sauerstoffeintrag ergibt sich bei der Strömungsgeschwindigkeit von 10 mL min⁻¹. Der

gemessene Sauerstoffpartialdruck beträgt 85 % (s. Abb. 4-19), somit ist die Konzentrationsdifferenz 15 %. Die treibende Kraft für den Sauerstofftransport ist allerdings trotzdem kleiner als bei der maximalen Differenz von 100 %. Für diese Versuchsbedingungen ergibt sich ein *OTR* von $9,83 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

Tab. 4-5: Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) verschiedener Zellen.

Art der Zellen	Art der Kultivierung	OCR [$\text{nmol min}^{-1} 10^{-6}$]	Quelle
Primäre porcine Hepatozyten	Monolayer	18 - 54	Hay et al 2001
Primäre porcine Hepatozyten (kryokonserviert)	Cytodex-3-Microcarrier	2,0 – 3,4	Custer und Mullon 1998
Primäre Ratten-hepatozyten	Sandwich	42 – 60	Smith et al 1996
HepG2	Cytodex-3-Microcarrier	4,2	Smith et al 1996
HepG2	Monolayer	2 – 3	Metzen et al 1995
CHO	Suspension	5,2	Jorjani und Ozturk 1999
BHK	Suspension	5,0	Jorjani und Ozturk 1999

In Tab. 4-5 sind verschiedene Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate, OCR) von primären Leberzellen, der Leberzelllinie HepG2 und den Produktionszelllinien BHK und CHO aufgelistet. Primäre Hepatozyten benötigen mit einer Verbrauchsrate von bis zu $60 \text{ nmol min}^{-1} 10^{-6}$ deutlich mehr Sauerstoff als die Zelllinien. Die Angaben für den Sauerstoffverbrauch primärer Hepatozyten unterliegen starken Schwankungen. Verantwortlich dafür sind verschiedene Parameter wie z.B. die Herkunft der Zellen, das Alter der Kultur, die Zelldichte und die Strömungsgeschwindigkeit bei der sie kultiviert werden (Hay 2001, Smith 1996).

Der deutlich geringere O_2 -Verbrauch von HepG2 spiegelt die verminderte metabolische Aktivität dieser Zelllinie wieder, obwohl sie eigentlich noch als differenziert gezählt wird

(Smith 1996). Es sind nur geringfügige Unterschiede im Sauerstoffverbrauch der Leberzelllinie zu dem der Zelllinien CHO und BHK festzustellen.

Zur Betrachtung der Sauerstoffversorgung im Reaktor wird der ungünstigste Fall angenommen: Eine Sauerstoffaufnahme von $60 \text{ nmol min}^{-1} 10^{-6}$ führt bei einer Zelldichte von $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ zu einem O_2 -Bedarf von $3,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$. Diesem Wert steht ein Sauerstoffeintrag von $9,83 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 10 mL min^{-1} gegenüber. Damit scheint die Sauerstoffversorgung der Zellen im Oxy-HFB selbst bei ungünstigsten Bedingungen sichergestellt zu sein.

Die Überlegungen zur Sauerstoffversorgung beim Oxy-HFB können direkt auf den Quadrox übertragen werden. Zum einen handelt es sich bei beiden Reaktortypen um dieselbe Oxygenierungsmethode und die gleichen Hohlfasern, zum anderen wurde der Quadrox speziell für die Oxygenierung entwickelt. Leider konnte keine angemessene Lösung gefunden werden, den Sauerstoffpartialdruck in der Nähe des Reaktoreingangs zu messen, um ähnliche Betrachtungen wie beim Oxy-HFB anzustellen. Der Messpunkt in der Nähe des Gaseingangs ist nur von geringem Nutzen, da sich ausgerechnet in dieser Region ein Totraum befindet (siehe Kap. 4.1) und somit nicht die wirklichen Verhältnisse im Reaktor dargestellt werden können.

Ein Ziel der Versuchsreihe, die Bestimmung des k_La -Wertes, konnte nicht erreicht werden. Eine Auswertung der Sauerstoffent- und -aufladekurven nach der dynamischen Gasaustauschmethode führte zu keinem konstanten k_La -Wert. Die Verhältnisse in den Hohlfaserreaktoren sind komplexer als im „klassischen“ Rührkesselreaktor, der viele vereinfachende Annahmen zulässt. Daher wurde auf die Angabe eines k_La -Wertes verzichtet und auf anderem Wege gezeigt, dass die Oxygenierungsleistung der Reaktoren für die Kultivierung von Leberzellen ausreichend ist.

4.5 Zusammenfassung

Die Grundanforderungen an einen Bioreaktor sind neben dem Ausschluss von Fremdkeimen und/oder der Freisetzung der Organismen eine homogene Verteilung der Nährstoffe, optimale Kultivierungsbedingungen (Wachstum, Produktivität) und ein ausreichender Sauerstoffeintrag (Gasaustausch). Für die Kultivierung von adhärenenten Zellen ist zusätzlich auch noch eine feste Mikrostruktur nötig, die die *in vivo*-Situation gut imitiert.

In den meisten Reaktorsystemen wird viel Energie darauf verwendet, eine homogene Verteilung und einen guten Sauerstoffeintrag zu erreichen. Die ideale Durchmischbarkeit ist eine Anforderung, auf die die hier untersuchten Bioreaktorsysteme nicht ausgelegt sind. Sie ist durch eine sehr viel kleinere Mischzeit gegenüber der mittleren Verweilzeit definiert und soll die homogene Verteilung sicherstellen. Betrachtet man die Mischzeit beim Oxy-HFB ($7,5 \text{ mL h}^{-1}$ Strömungsgeschwindigkeit, $12,5 \text{ mL}$ Gesamtvolumen) von 4 – 5 h und stellt sie der Standzeit von 48 h zwischen den Mediumwechseln gegenüber, so sind keine großen Konzentrationsdifferenzen bei der Kultivierung von tierischen Zellen zu erwarten.

Der Sauerstoffeintrag erweist sich selbst im Vergleich zu konventionell eingesetzten Bioreaktoren im Quadrox und im Oxy-HFB als gut, so dass hier keine Limitierungen zu erwarten sind.

Speziell der Oxy-HFB scheint somit für die Kultivierung adhärenenter tierischer Zellen gut geeignet zu sein. Durch den einfachen Aufbau und den Verzicht auf zusätzliche Trägerstrukturen im Reaktor werden lange Diffusionsstrecken sowohl für den Gasaustausch als auch für Substrate und Produkte vermieden. Nachteilig beim Quadrox ist der Totraum, der sich bei den für die Kultivierung geeigneten Strömungsgeschwindigkeiten nicht vermeiden lässt.

Die Durchströmbarkeit des Systems ermöglicht eine freie Wahl in der Prozessführung (kontinuierlich, halbkontinuierlich oder batchweise) und bietet somit eine zusätzliche Prozessvariable zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen. Dadurch werden lange Prozesszeiten ermöglicht, die in einem stationären System nicht erreicht werden können.

Die dichte Struktur der Hohlfasern im Reaktor macht ein Zellrückhaltesystem für adhärenente Zellen überflüssig, so dass auch hier zusätzlicher Aufwand entfällt.

5 Ergebnisse

5.1 Kultivierung von primären Hepatozyten im Quadrox

Die generelle Eignung des Quadrox zur Kultivierung primärer, adhärenter Zellen wurde anhand der Kultivierung primärer porciner Hepatozyten gezeigt. Dazu wurden der Primärmetabolismus und die Biotransformationsleistung der Hepatozyten über einen Kultivierungszeitraum von 22 Tagen bestimmt und mit den Werten von Kultivierungen in Petrischalen verglichen (je vier Hepatozyten-Isolationen). Zusätzlich wurde überprüft, ob der Einsatz der Oxygenierungsfasern aus PP (Polypropylen, mikroporös) und PMP (Polymethylpenten, dicht) zu unterschiedlichen Ergebnissen führt.

5.1.1 Prozess

Während der Kultivierung wurden der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck pO_2 im Mediumüberstand kontrolliert. Es gab während der gesamten Zeit in Kultur keine Auffälligkeiten, die auf Infektionen oder andere Störungen schließen ließen.

Bei mehreren Kultivierungen im Quadrox mit mikroporösen PP-Fasern kam es in der dritten Woche in Kultur zu einem „Leakage“ der Membranen: Flüssigkeit aus dem Medium gelangte durch die Hohlfasermembran in die Begasungsseite und trat aus dem Begasungsausgang aus. Kultivierungen mit dichten PMP-Fasern führten zu keinem „Leakage“.

5.1.2 Primärstoffwechsel

Glukose:

Der Glukoseverbrauch oder die Bildung von Glukose in einer Kultur ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der biochemischen Abläufe in der Zelle und der Sauerstoffversorgung. In Abb. 5-1 ist der Glukoseverbrauch über die gesamte Kultivierungsdauer im Quadrox und in der Kontrolle dargestellt. Bei der Kultivierung im Quadrox mit PP-Fasern bleibt der Glukoseverbrauch auf einem niedrigen Niveau im Bereich zwischen 0,01 und $0,05 \text{ mmol h}^{-1} 10^{-9}$ konstant. Deutlich höher ist der Glukoseverbrauch bei der Kultivierung auf PMP-Fasern. Während der ersten zehn Kulturtage steigt der Verbrauch stetig an, bis er sich ab dem 12. Kulturtag bei $0,2 - 0,25 \text{ mmol h}^{-1} 10^{-9}$ stabilisiert. Der Glukoseverbrauch in der Kontrolle verhält sich in den ersten Tagen nahezu identisch zu dem

im Quadrox (PMP). Ab dem 12. Tag in Kultur stabilisiert sich der Verbrauch allerdings auf einem Level von $0,12 - 0,14 \text{ mmol h}^{-1} 10^{-9}$ und liegt somit zwischen den Verbrauchsraten von Quadrox (PMP) und Quadrox (PP).

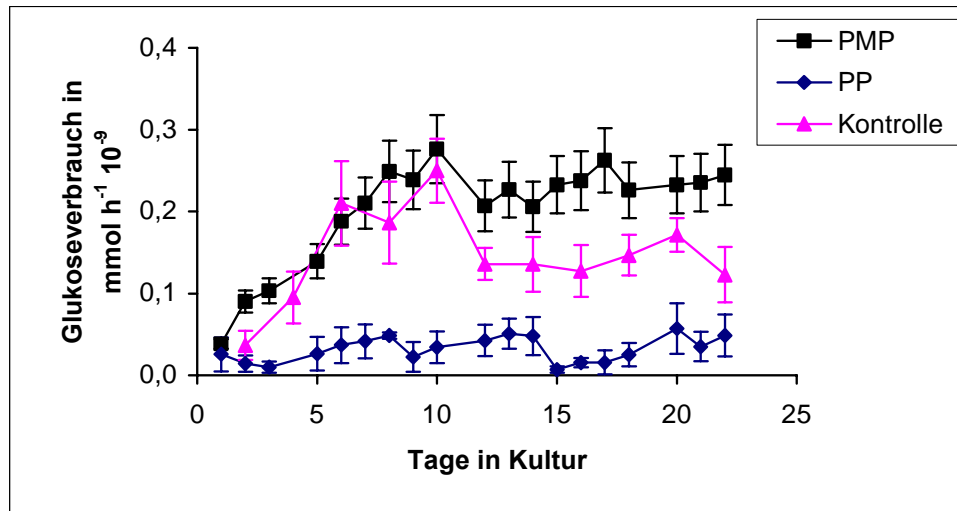


Abb. 5-1: Glukoseverbrauch im Quadrox mit PP- bzw. PMP-Hohlfasern im Vergleich zur Kontrolle.

Laktat:

Auch die Laktatbildung lässt Rückschlüsse auf die biochemischen Abläufe in der Zelle und die Sauerstoffversorgung zu. Abb. 5-2 zeigt die Laktatbildung.

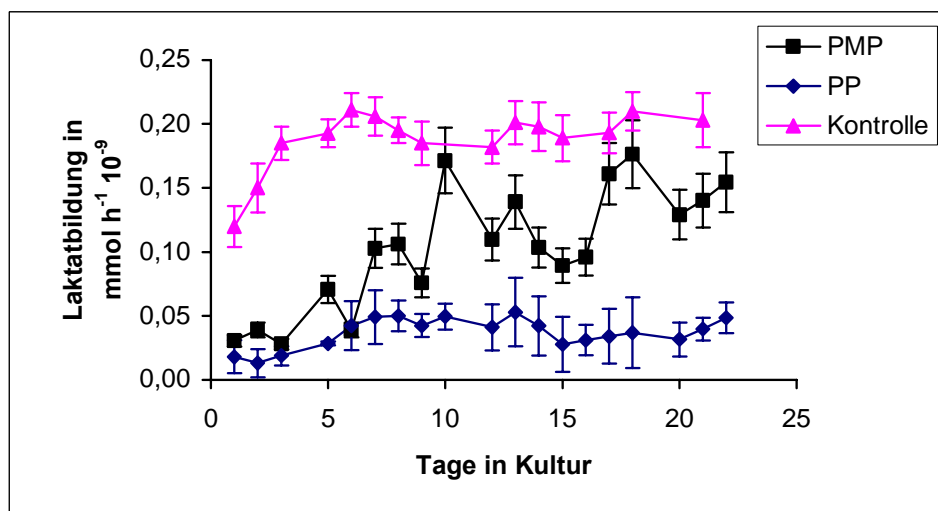


Abb. 5-2: Laktatbildung im Quadrox mit PP- bzw. PMP-Hohlfasern im Vergleich zur Kontrolle.

Die Laktatbildung im Quadrox (PP) ist mit $0,03 - 0,05 \text{ mmol h}^{-1} 10^{-9}$ über den Kultivierungszeitraum stabil und deutlich niedriger als in der Kontrolle und im Quadrox (PMP). Im Quadrox (PMP) steigt die Bildungsrate während der gesamten Kultivierungsdauer

von etwa $0,03 \text{ mmol h}^{-1} 10^{-9}$ auf $0,15 \text{ mmol h}^{-1} 10^{-9}$ an. In der Kontrolle steigt die Laktatbildung während der ersten fünf Kulturtage von 0,12 auf etwa $0,20 \text{ mmol h}^{-1} 10^{-9}$ an und bleibt dann während der restlichen Zeit in Kultur stabil.

Harnstoff:

Die Fähigkeit zur Harnstoffsynthese setzt einen intakten Energiehaushalt der Zelle voraus und ist somit ebenfalls ein wichtiger Parameter zur Beurteilung einer Hepatozytenkultur. In Abb. 5-3 sind die Syntheseraten für Harnstoff unter den jeweiligen Kultivierungsbedingungen dargestellt. Sowohl bei den Kultivierungen im Quadrox als auch in der Kontrolle erscheint die Harnstoffsynthese über den untersuchten Zeitraum stabil. Unter allen Kultivierungsbedingungen werden zwischen $0,07$ und $0,12 \text{ mmol h}^{-1} 10^{-9}$ Harnstoff gebildet.

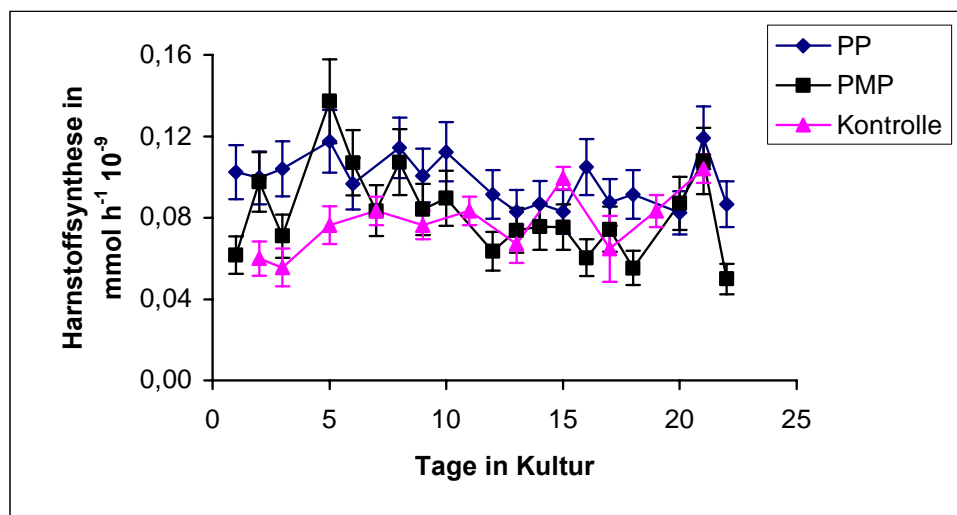


Abb. 5-3: Harnstoffsynthese im Quadrox mit PP- bzw. PMP-Hohlfasern im Vergleich zur Kontrolle.

Albumin:

Eine hohe Albuminsekretion ist ein Zeichen für eine vitale Hepatozytenkultur. Die Sekretionsraten sind in Abb. 5-4 dargestellt. Unter allen drei Kultivierungsbedingungen ist eine über den Kultivierungszeitraum stabile Sekretion zu beobachten, die sekretierte Albuminmenge ist in der Kontrolle aber mit $0,9 - 1,2 \text{ mg h}^{-1} 10^{-9}$ beinahe doppelt so hoch (Faktor 1,9) wie in den Kultivierungen im Quadrox (PMP und PP) mit $0,5 - 0,7 \text{ mg h}^{-1} 10^{-9}$. Während die Albuminsekretion in beiden Hohlfaserreaktoren über den untersuchten Zeitraum stabil bleibt, nimmt sie in der Kontrolle am Ende der Kultivierungsdauer geringfügig auf $0,8 \text{ mg h}^{-1} 10^{-9}$ ab.

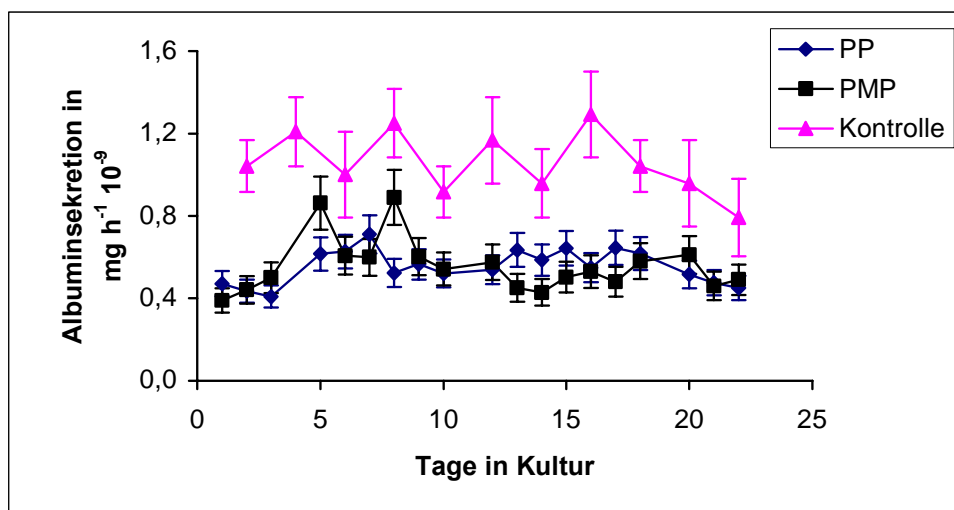


Abb. 5-4: Albuminsekretion im Quadrox mit PP- bzw. PMP-Hohlfasern im Vergleich zur Kontrolle.

5.1.3 Biotransformation

Die Biotransformationsleistung der Hepatozytenkultur im Quadrox wurde mit Hilfe des Diazepam-Metabolismus (Phase I-Reaktion) charakterisiert. Beim Diazepam-Abbau entstehen Nordazepam und Temazepam als Zwischenprodukte und Oxazepam als vorläufiges Endprodukt. In Abb. 5-5 sind die nach 24 h Inkubation im Quadrox (PP) und Quadrox (PMP) gefundenen Metabolitkonzentrationen zu sehen.

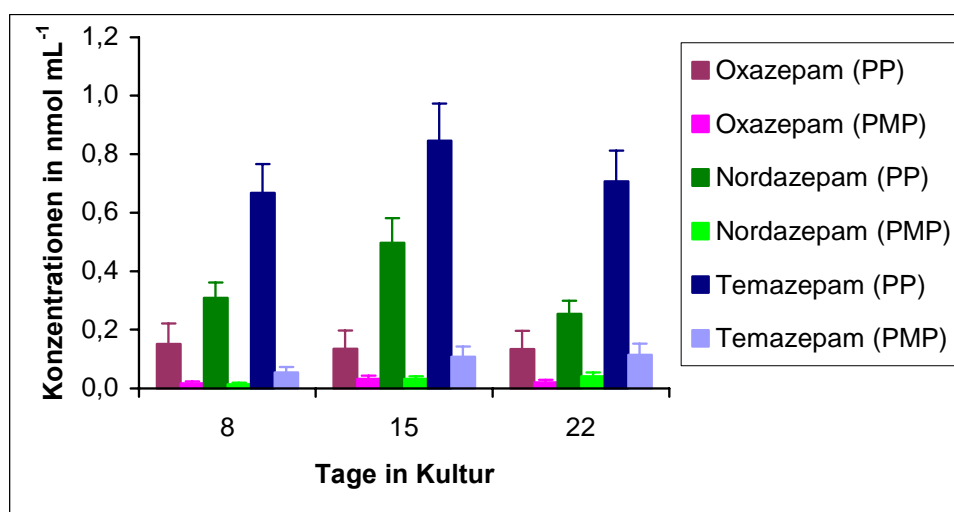


Abb. 5-5: Metabolitkonzentrationen beim Diazepam-Abbau im Quadrox mit PP- bzw. PMP-Hohlfasern.

Auf den ersten Blick fallen die großen Unterschiede zwischen Kultivierungen auf PP- und PMP-Fasern auf. Die gefundenen Konzentrationen sind im Quadrox (PP) um den Faktor 2 – 6 für Oxazepam, 6 – 21 für Nordazepam und 6 – 12 für Temazepam höher als im Quadrox

(PMP). Dabei nimmt der Unterschied über den Kultivierungszeitraum ab. Während die Metabolitkonzentrationen im Quadrox (PP) am 15. Kulturtag ein leichtes Maximum aufweisen, nehmen die Konzentrationen im Quadrox (PMP) über den Kultivierungszeitraum in geringem Maße zu.

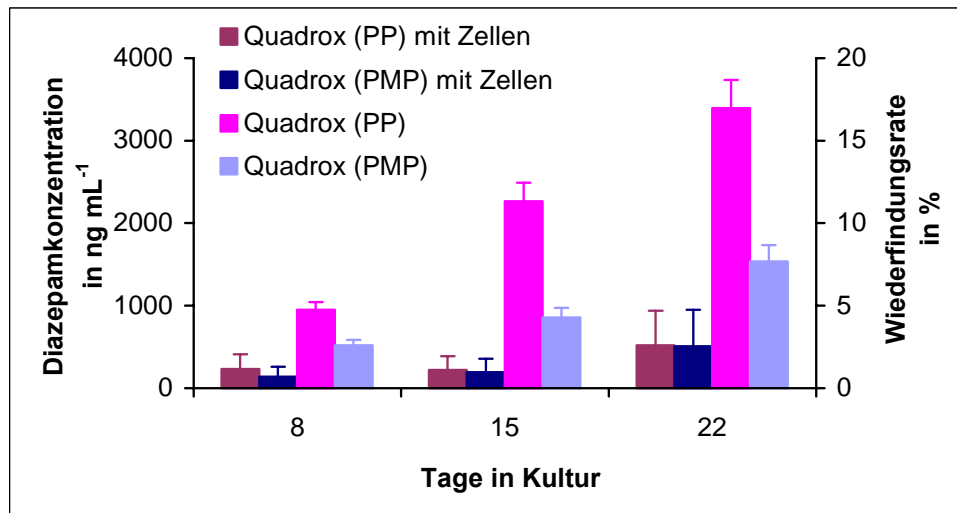


Abb. 5-6: Diazepam-Konzentrationen im Quadrox mit PP- bzw. PMP-Hohlfasern nach 24 h Inkubation mit und ohne Zellen. An der linken Achse ist die Diazepam-Konzentration in ng mL⁻¹ angegeben. Die rechte Achse gibt die Wiederfindungsrate an, die das prozentuale Verhältnis der am Ende der Inkubationszeit gemessenen Konzentration zur Ausgangskonzentration von 20 000 ng mL⁻¹ darstellt.

Zusätzlich zu den Metabolitkonzentrationen wurde die Substratkonzentration im Bioreaktor bestimmt. Die gefundenen Konzentrationen sind in Abb. 5-6 für Bioreaktoren mit Zellen und für die Bioreaktoren ohne Zellen dargestellt.

Erwartungsgemäß ist in den Bioreaktoren mit Zellen weniger Diazepam zu finden als in denen ohne Zellen (BR-Kontrollen). Bei Betrachtung der wiedergefundenen Menge in den BR-Kontrollen stellt man fest, dass maximal 17 % der ursprünglich eingesetzten Diazepammenge im Quadrox mit PP-Fasern und 7,5 % im Quadrox mit PMP-Fasern nach der dritten 24 h-Inkubation am Tag 22 wiedergefunden werden. Nach der ersten 24 h-Inkubation an Tag 8 werden sogar nur 5 % bzw. 2,5 % des Diazepams nachgewiesen, nach der zweiten Inkubation sind es bereits 11 % bzw. 4 %. Die Diazepamkonzentration in Bioreaktoren mit Zellen beträgt 1 – 2 % (PP) bzw. 0,5 – 2 % (PMP) und nimmt über den Kultivierungszeitraum geringfügig zu. Die Differenz zwischen den Hohlfasertypen ist somit geringer als in den BR-Kontrollen.

5.1.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, primäre Leberzellen im Quadrox zu kultivieren. Vergleicht man die Daten des Primärmetabolismus mit denen der Kontrolle, so liegen alle Werte etwa im selben Bereich. Lediglich die Albuminsekretion, ein Zeichen für eine vitale Hepatozytenkultur, ist in der Kontrolle fast doppelt so hoch wie bei Kulturen im Quadrox. Die Auswertung der Biotransformationsdaten ist erschwert, da im Quadrox bei den PP- und besonders bei den PMP-Fasern große Adsorptionskräfte auftreten. Es kann jedoch festgestellt werden, dass zu jeder Zeit während der Kultivierung von primären Leberzellen Phase I-Metabolismus vorhanden war.

Es sind wenig Unterschiede bei Kultivierungen auf PP- und PMP-Hohlfasern festzustellen: PP-Fasern führen zu einem geringeren Glukoseverbrauch und einer geringeren Laktatbildung als in der Kontrolle, während Kultivierungen auf PMP-Fasern zu Werten führen, die in der Nähe der Kontrollwerte liegen. Die Auswertung der Biotransformation ist bei Kultivierungen auf PMP-Fasern schwieriger, da hier deutlich mehr Substanz von den Hohlfasern adsorbiert wird als in den PP-Fasern.

5.2 Kultivierung von primären Hepatozyten im Oxy-HFB

Basierend auf den Erfahrungen mit dem Quadrox wurde der Oxy-HFB entwickelt. Für die Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten wurden Bioreaktoren mit Hohlfasern aus PP und aus PMP verwendet. Es wurden Kultivierungen aus drei verschiedenen Isolationen mit je zwei Bioreaktoren durchgeführt ($n = 6$, für die Bestimmung der Biotransformationsleistung $n = 3$).

5.2.1 Nachweis der Eignung als Leberzellreaktor und Einfluss der Mediummenge

In dieser Versuchsreihe wurde die Eignung des Oxy-HFB als Leberzellreaktor und der Einfluss der Mediummenge auf die biochemische Leistung der Zellen untersucht. Als Kontrolle wurden 3×10^6 Zellen in einer Petrischale mit 3 mL Medium kultiviert, also im Verhältnis von $1 \text{ mL } 10^{-6}$. Im Oxy-HFB wurden die Verhältnisse $0,05 \text{ mL } 10^{-6}$, $0,25 \text{ mL } 10^{-6}$ und $1 \text{ mL } 10^{-6}$ getestet, die den Mediumvolumina von 2,5 mL, 12,5 mL und 50 mL

entsprechen. Damit wurde sowohl das minimale, durch den Reaktor vorgegebene Mediumvolumen von 2,5 mL als auch das dem in der Kontrolle entsprechende Verhältnis von 1 mL 10^{-6} ausgewählt.

5.2.1.1 Primärstoffwechsel

Glukose:

Der Glukoseverbrauch ist für 5×10^7 Zellen bei unterschiedlichen Mediummengen im Oxy-HFB in Abb. 5-7 dargestellt.

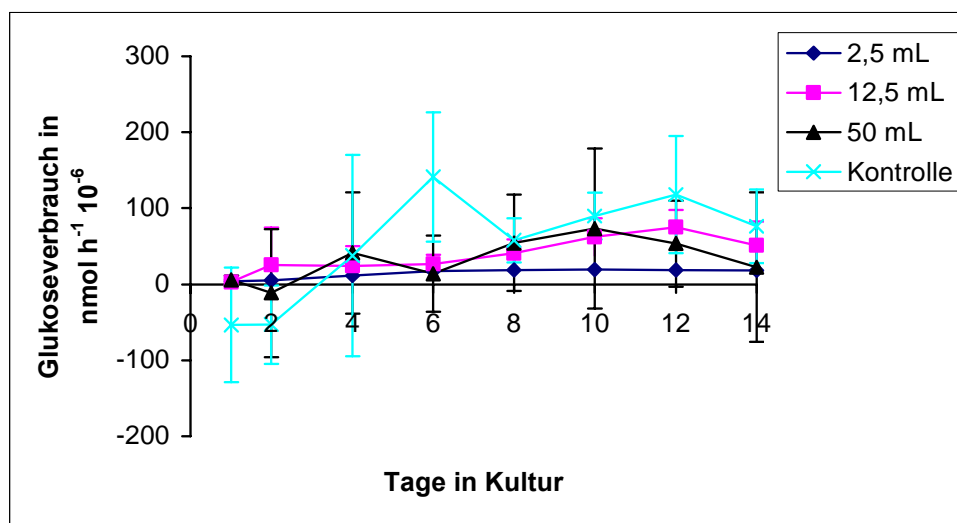


Abb. 5-7: Glukoseverbrauch im Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens im Vergleich zur Kontrolle.

Es sind deutliche Unterschiede im Verbrauch festzustellen: Während bei einem Mediumvolumen von 2,5 mL maximal $19 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ Glukose verbraucht werden, obwohl noch Glukose im Medium vorliegt (etwa 500 mg L^{-1}), steigt der Verbrauch mit Erhöhung des zur Verfügung gestellten Mediums in der zweiten Woche auf maximal $75 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ bei 12,5 mL und 50 mL Medium an. Die Schwankungen im Mediumverbrauch sind bei den Kultivierungen im Oxy-HFB geringer als bei der Kontrolle. In der Kontrolle wird in den ersten Tagen Glukose mit etwa $50 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ gebildet. Ab dem 4. Tag wird Glukose verbraucht, der mittlere Verbrauch liegt bei $100 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ und ist somit höher als in den Bioreaktoren.

Laktat:

Abb. 5-8 zeigt den Einfluss der Mediummenge auf die Laktatbildung. Während zwischen der Kontrolle und den Kultivierungen im Oxy-HFB große Unterschiede auftreten, sind diese bei der Variation des Mediumvolumens im Bioreaktor eher klein. Die Laktatbildung in der Kontrolle liegt in den ersten Tagen bei 20 - 50 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$, steigt dann auf 100 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$ in der zweiten Woche und ist somit mindestens 10 mal so hoch wie in den Bioreaktoren. Tendenziell wird umso mehr Laktat gebildet, je mehr Medium zur Verfügung steht: Bei einem Mediumvolumen von 2,5 mL beträgt die Laktatbildung 1,3 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$ am 14. Tag, bei 12,5 mL 8 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$ und bei 50 mL 10 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$. Bei 50 mL gibt es am zweiten Tag ein Maximum mit 27 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$.

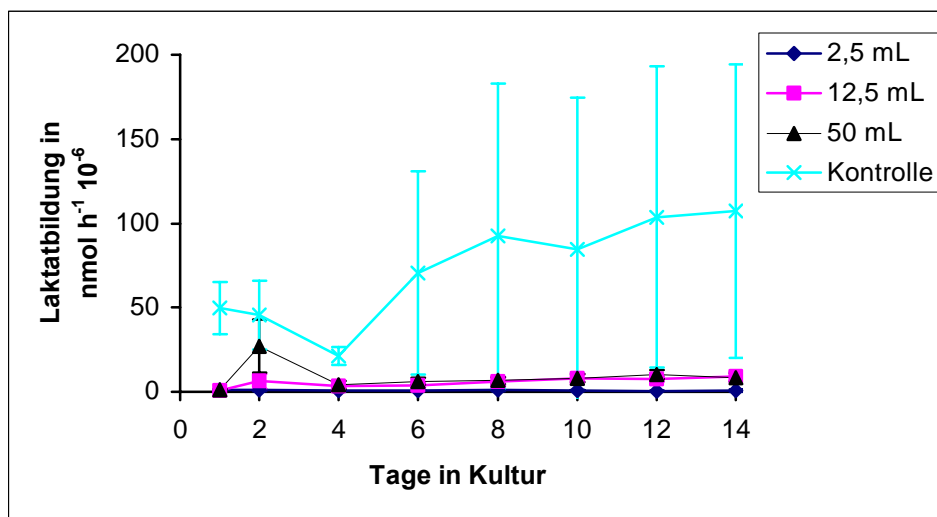


Abb. 5-8: Laktatbildung im Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens im Vergleich zur Kontrolle.

Harnstoff:

Der Einfluss des Mediumvolumens auf die Harnstoffsynthese ist in Abb. 5-9 dargestellt. Bei einem Mediumvolumen von 2,5 mL ist die Syntheserate zwar sehr stabil, beträgt aber nur 10 - 20 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$. Während der ersten Woche in Kultur ist bei einem Volumen von 12,5 mL eine deutlich höhere und stabile Harnstoffsynthese (ca. 56 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$) zu beobachten, die aber im weiteren Verlauf auf etwa 20 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$ abfällt. Ein Mediumvolumen von 50 mL führt zu einer Harnstoffsynthese von 80 - 90 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$ in der ersten Woche, die in der zweiten Woche auf 120 $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$ steigt. Die Syntheserate der Kontrolle liegt zwischen denen von 12,5 mL und 50 mL: In der ersten Woche werden

ungefähr $55 - 60 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ synthetisiert, in der zweiten Woche steigt die Syntheserate auf maximal $96 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ am 14. Tag.

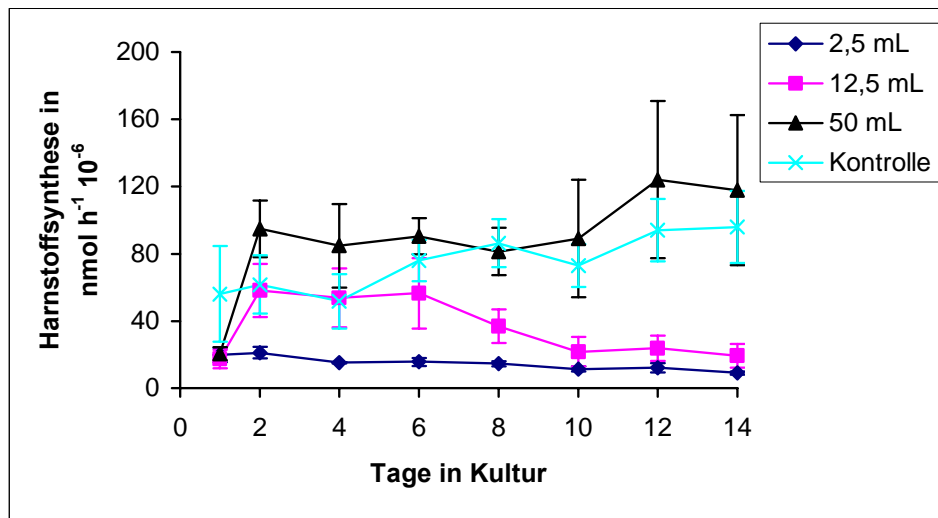


Abb. 5-9: Harnstoffsynthese im Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens im Vergleich zur Kontrolle.

Albumin:

In Abb. 5-10 wird die Albuminsekretion in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Mediummenge gezeigt.

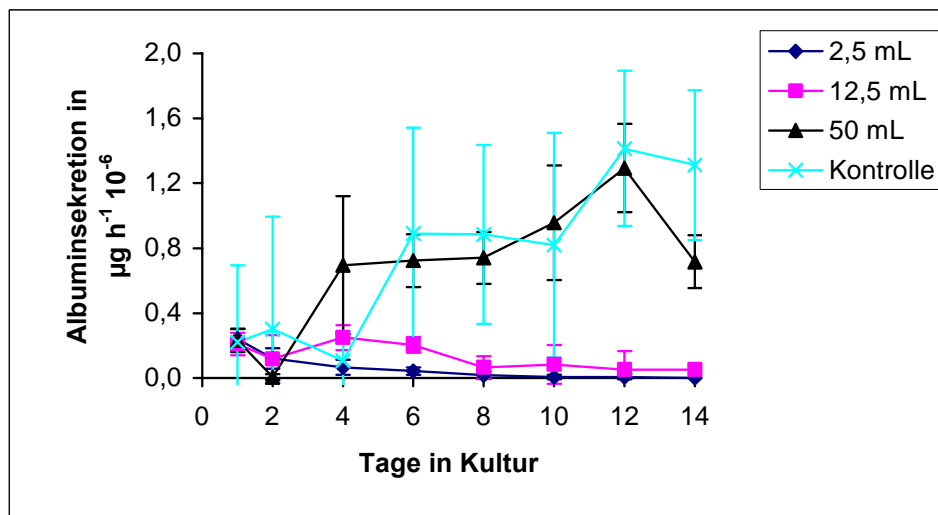


Abb. 5-10: Albuminsekretion im Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens im Vergleich zur Kontrolle.

Bei den geringen Volumina von 2,5 und 12,5 mL wird eine deutlich niedrigere Albuminsekretion (maximal $0,2 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$) gemessen, als bei 50 mL (maximal $1,3 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$) und in der Kontrolle mit bis zu $1,4 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ an Tag 12. Bei 50 mL und in der Kontrolle ist ein über die gesamte Kulturdauer ansteigender Trend zu erkennen, während bei Kultivierungen mit geringerem Mediumvolumen ein abfallender Trend zu erkennen ist.

LDH:

LDH ist in jeder Zelle vorhanden. Wird die Zellmembran geschädigt, wird das im Cytosol lokalisierte LDH freigesetzt und kann im Medium nachgewiesen werden. In Abb. 5-11 ist die LDH-Aktivität im Medium vom Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens dargestellt.

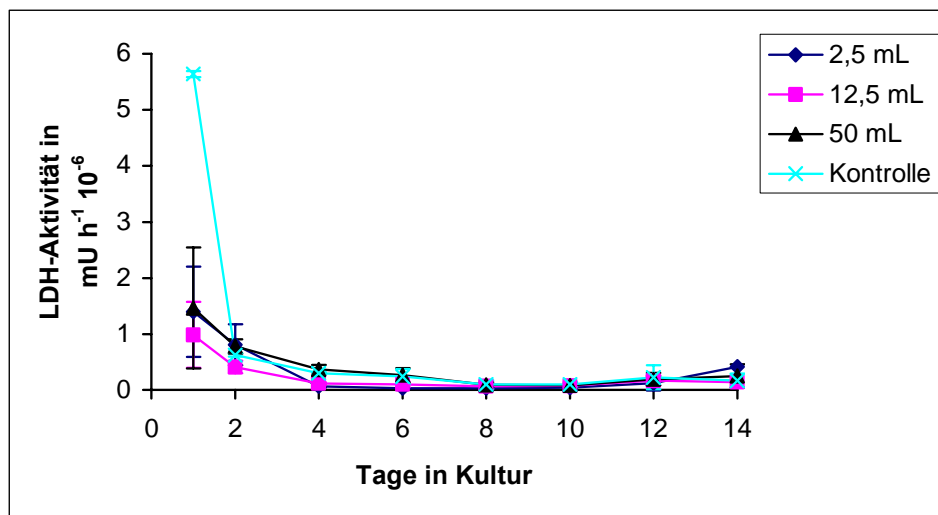


Abb. 5-11: LDH-Aktivität im Medium vom Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens im Vergleich zur Kontrolle.

Am ersten Tag in Kultur ist in den Bioreaktoren eine Aktivität von $1,4 \text{ mU h}^{-1} 10^{-6}$ nachzuweisen, die innerhalb weniger Tage auf unter $0,1 \text{ mU h}^{-1} 10^{-6}$ zurückgeht. In der Kontrolle ist die Aktivität mit $7,5 \text{ mU h}^{-1} 10^{-6}$ am ersten Tag sehr viel höher, sinkt aber während der folgenden Tage ebenfalls bis auf unter $0,1 \text{ mU h}^{-1} 10^{-6}$ ab. Ab dem 12. Tag ist sowohl in den Bioreaktoren als auch in der Kontrolle ein geringer Anstieg der Aktivität zu messen. Es sind keine auf die Variation des Mediumvolumens zurückzuführenden Änderungen feststellbar.

Zellaustrag:

Bei jedem Mediumwechsel wurde die Zahl der Zellen im Medium bestimmt. Der prozentuale Zellaustrag unter Variation des Mediumvolumens ist in Abb. 5-12 dargestellt. Der Zellaustrag ist unabhängig von dem eingesetzten Mediumvolumen und verhält sich in der Kontrolle ähnlich wie in den Bioreaktoren. Tendenziell kann aber bei einem hohen Mediumvolumen-Zellzahl-Verhältnis ein etwas höherer Zellaustrag (6,8 - 7,2 %) festgestellt werden als bei einem niedrigen Verhältnis (4,3 - 5 %).

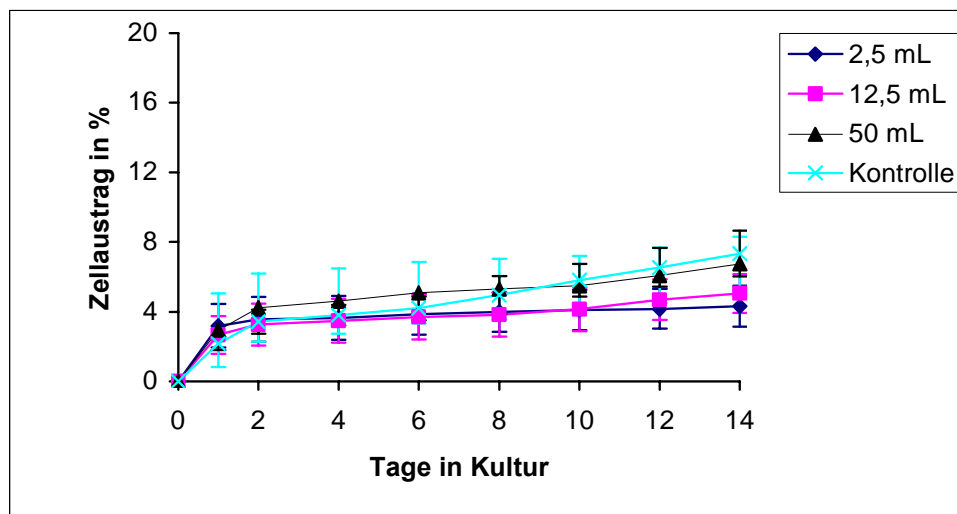


Abb. 5-12: Zellaustrag bei der Kultivierung im Oxy-HFB unter Variation der Zellzahl. Die Zahl der ausgetragenen Zellen wurde dabei auf die Zahl der eingesäten Zellen bezogen.

5.2.1.2 Biotransformation

Zur Beurteilung der Biotransformationsfähigkeiten wurden verschiedene Enzym-Aktivitäten des Phase I- und II- Metabolismus untersucht.

ECOD:

Bei der Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) handelt es sich um eine Monooxygenase des Phase I-Metabolismus, die die Ethylgruppe vom Substrat 7-Ethoxycoumarin abspaltet und so das Produkt Umbelliferon bildet.

Die Aktivität von ECOD wird in Abb. 5-13 gezeigt. In der Kontrolle ist die Aktivität von ECOD deutlich höher als unter allen Bedingungen in den Bioreaktoren. Die Aktivität beträgt am zweiten Tag $245 \text{ pmol h}^{-1} 10^{-6}$ und sinkt im weiteren Verlauf auf 25 - 30 % dieses Wertes ab ($62 - 71 \text{ pmol h}^{-1} 10^{-6}$). Am zweiten Tag ist bei den Kultivierungen im Oxy-HFB deutlich

ein Absinken der Aktivität mit Zunahme des Mediumvolumens zu erkennen: 2,5 mL führen zu einer Aktivität von $110 \text{ pmol h}^{-1} 10^{-6}$, 12,5 mL zu $68 \text{ pmol h}^{-1} 10^{-6}$ und 50 mL zu $22,5 \text{ pmol h}^{-1} 10^{-6}$. Während ein geringes Mediumvolumen zu einem Abfall auf 20 - 30 % der Ausgangsaktivität führt, bleibt diese bei 50 mL stabil. Zu jedem Zeitpunkt während der Kultivierungen in den Bioreaktoren und der Kontrolle wird ein kleiner Teil des Produktes Umbelliferon glukuronidiert.

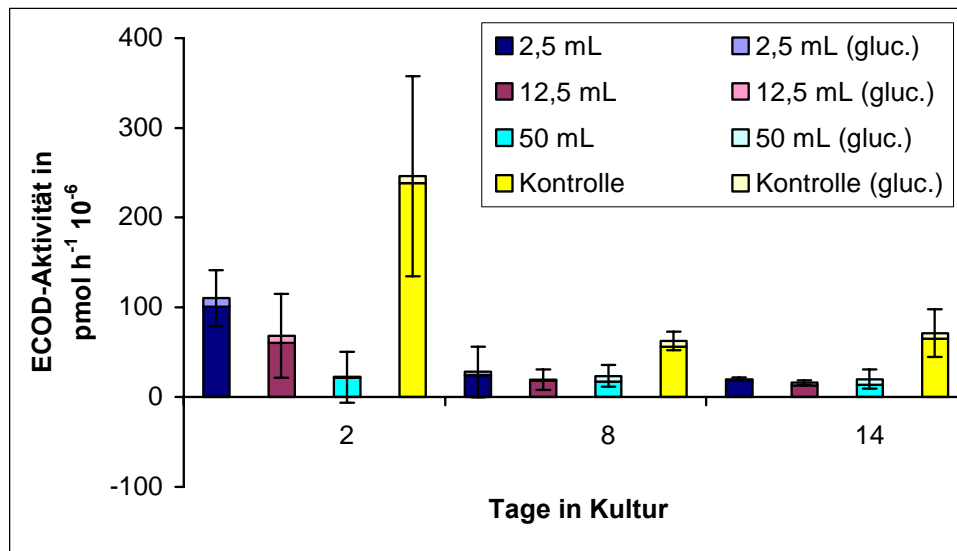


Abb. 5-13: ECOD-Aktivität bei der Kultivierung im Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens.

EROD:

Neben dem Enzym ECOD wurde eine andere Monooxygenase des Phase I-Metabolismus, die Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) untersucht. EROD spaltet vom Substrat 7-Ethoxyresorufin die Ethylgruppe ab und bildet so das Produkt Resorufin.

Der Einfluss des Mediumvolumens auf die EROD-Aktivität ist in Abb. 5-14 dargestellt. Es zeigt sich ein deutlich anderes Bild als bei ECOD. Zu jedem Zeitpunkt ist eine Zunahme der Aktivität von EROD mit Zunahme des Mediumvolumens zu erkennen. Dabei beträgt die Aktivität bei 50 mL etwa 50 % der Aktivität der Kontrolle, bei 12,5 mL sind es 20 % und bei 2,5 mL ungefähr 5 %. In allen Kulturen nimmt die Aktivität über den Kultivierungszeitraum um ca. 30 – 50 % ab. Sowohl im Oxy-HFB als auch in der Kontrolle wurden maximal 35 % des Resorufins glukuronidiert.

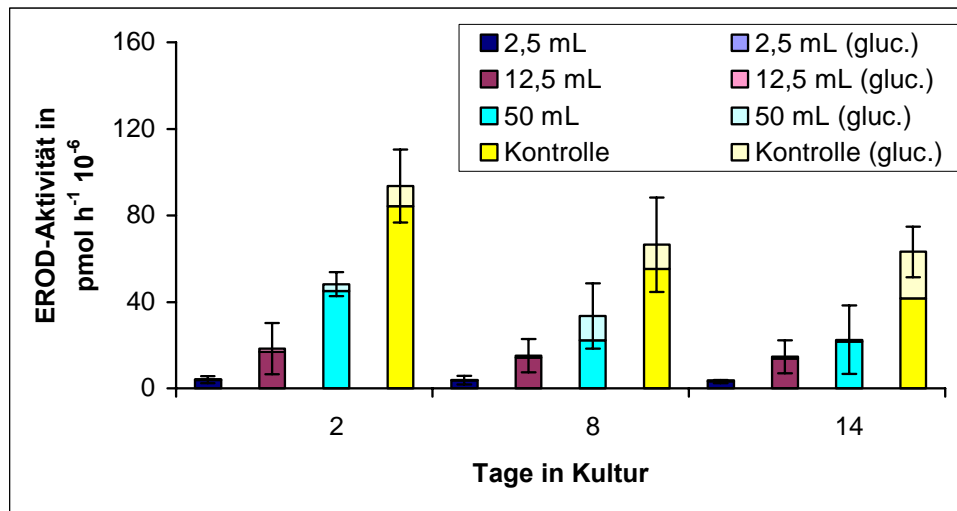


Abb. 5-14: EROD-Aktivität bei der Kultivierung im Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens.

UGT:

Zusätzlich zu den Phase I-Enzymen ECOD und EROD wurden die Phase II-Enzyme UGT und ST auf ihre Funktion überprüft. Die Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase UGT verknüpft das Substrat 4-Methylumbelliferon mit Glucuronat und bildet so Methylumbelliferon-7-Glucuronid (MUG). Abb. 5-15 zeigt die Aktivität von UGT unter Variation des Mediumvolumens.

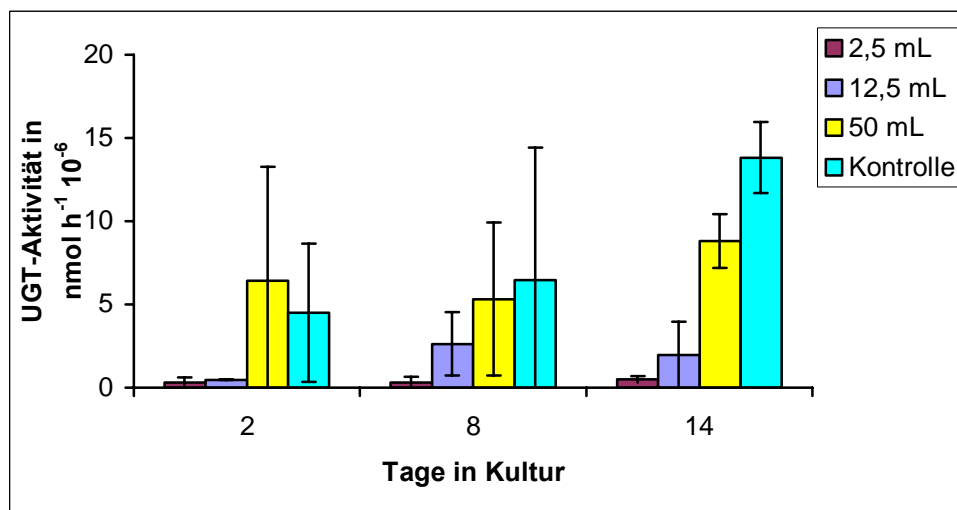


Abb. 5-15: UGT-Aktivität bei der Kultivierung im Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens.

Das Verhalten von UGT ähnelt stark dem von EROD: Es ist ein deutlicher Anstieg der Aktivität mit Zunahme des Mediumvolumens zu sehen. Im Gegensatz zu EROD nimmt die Aktivität allerdings nicht über den Kultivierungszeitraum ab, sondern zu. Ein Mediumvolumen von 2,5 mL führt zu maximal $0,5 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$, 12,5 mL zu $2,2 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$, 50 mL zu $8,8 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$ und die Kontrolle zu $13,8 \text{ nmol h}^{-1} 10^{-6}$.

ST:

4-Methylumbelliferon wird nicht nur durch UGT, sondern auch durch die Sulfotransferase ST metabolisiert. ST führt eine Veresterung des 4-MU mit einem Sulfatrest durch und baut es zu Methylumbelliferon-7-Sulfat (MUS) ab.

Die ST-Aktivität unter Variation des Mediumvolumens wird in Abb. 5-16 gezeigt. Es ist wegen der großen Standardabweichungen schwer, die ST-Aktivitäten auszuwerten. Prinzipiell ist aber ein gegenläufiger Trend zu UGT zu erkennen, während UGT über den Kultivierungszeitraum zunimmt, verringert sich die Aktivität von ST.

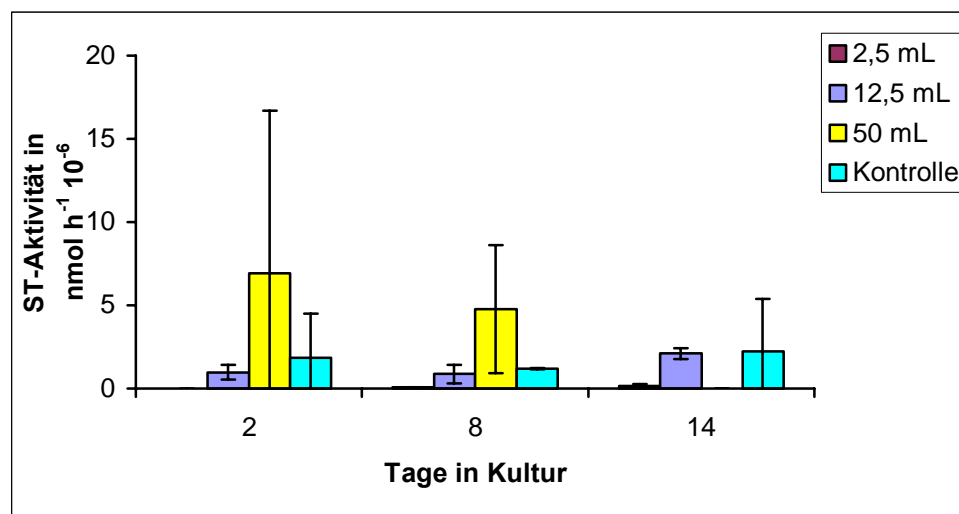


Abb. 5-16: ST-Aktivität bei der Kultivierung im Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens.

4-Methylumbelliferon (4-MU):

In Abb. 5-17 ist die Konzentration von 4-MU nach der Inkubation auf den Zellen dargestellt. Die Konzentrationen von 2,5 mL, 12,5 mL und der Kontrolle unterscheiden sich nur geringfügig mit 15 – 25 μM . Ein Mediumvolumen von 50 mL führt hingegen zu 28 μM an Tag 2 und 47 μM an Tag 14. Die Ausgangskonzentration betrug 100 μM .

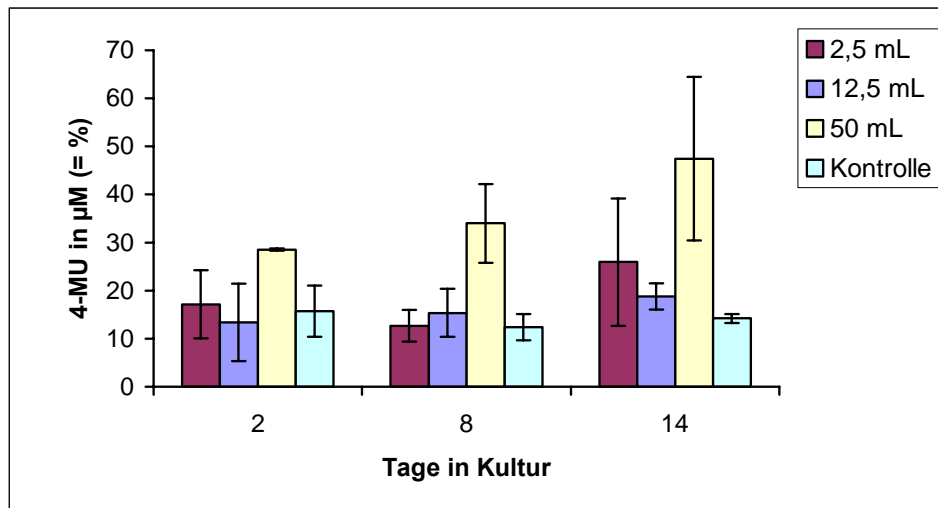


Abb. 5-17: 4-MU-Konzentration bei der Kultivierung im Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens. Der Zahlenwert der Konzentration entspricht der Wiederfindungsrate in %, da ursprünglich 100 µM eingesetzt wurde.

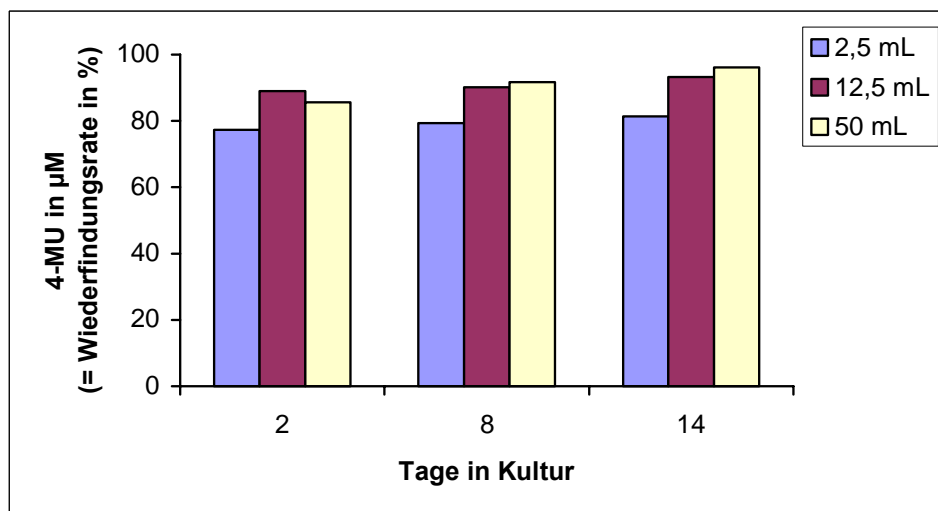


Abb. 5-18: 4-MU-Konzentrationen im Oxy-HFB unter Variation des Mediumvolumens nach 4 h Inkubation mit 100 µM ohne Zellen. Der Zahlenwert der Konzentration entspricht der Wiederfindungsrate in %.

Abb. 5-18 zeigt die 4-MU-Konzentrationen nach einer 4 h-Inkubation in Bioreaktoren ohne Zellen. Ein Mediumvolumen von 2,5 mL führt zu Wiederfindungsraten von 77 % am zweiten Tag und 81 % am 14. Tag. Erhöht man das Volumen auf 50 mL, so beträgt die Wiederfindungsrate 86 % am zweiten Tag und 96 % am 14. Tag. In der Kontrolle (nicht gezeigt) beträgt die Wiederfindungsrate durch den Verdünnungseffekt der Collagenschicht 75 %.

5.2.1.3 Zusammenfassung

Sowohl die Daten aus dem Primärmetabolismus als auch die Biotransformationsleistungen zeigen, dass es möglich ist, Zellen im Oxy-HFB zu kultivieren. Die Erhöhung des Mediumvolumens auf 50 mL führt zu einer deutlichen Verbesserung der biochemischen Leistung der Zellkultur. Bei weiterhin niedrigem Glukoseverbrauch und geringer Laktatbildung wird Albumin und Harnstoff in gleicher Menge wie in der Kontrolle produziert. Die Biotransformationsleistungen verbessern sich ebenfalls mit der Erhöhung des Mediumvolumens, obgleich die zellspezifische Leistung in der Kontrolle besser ist. Adsorptionseffekte in den Bioreaktoren erschweren dabei die Auswertung der Daten zur Biotransformation.

5.2.2 Einfluss des Hohlfasermaterials

Bei der Kultivierung von Leberzellen im Quadroxx traten Unterschiede in der Qualität der Kultur auf, wobei nicht geklärt wurde, ob diese auf das eingesetzte Hohlfasermaterial Polypropylen (PP) und Polymethylpenten (PMP) beruhten oder ob andere Faktoren dafür verantwortlich waren. Deshalb wurden primäre Leberzellen parallel in Oxy-HFBs mit Hohlfasern aus mikroporösem PP und aus dichtem PMP kultiviert.

Während der zweiwöchigen Kultivierung wurden dieselben Parameter des Primärmetabolismus und der Biotransformation untersucht wie bereits in Kap. 5.2.1. Dabei wurden keine zellspezifischen Unterschiede zwischen Kultivierungen auf Hohlfasern aus PP oder PMP gefunden. Da die mikroporösen Hohlfasern aus PP vor allem bei Kultivierungen im Quadroxx zum „Leakage“ neigten, wurden alle weiteren Versuche mit Hohlfasern aus PMP durchgeführt.

5.2.3 Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit

Das Finden der optimalen Strömungsgeschwindigkeit kann dazu beitragen, die Differenzierung der Zellen aufrechtzuerhalten (Flendrig et al 1997a, Nyberg et al 1992b). Eine zu starke Strömung würde allerdings zu Scherstress führen, der den Zellen schadet.

Tab. 5-1: Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit von 7,5, 15 und 60 mL h⁻¹ auf die Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten im Oxy-HFB in der ersten (W1) und zweiten (W2) Woche in Kultur.

	Parameter	7,5 mL h ⁻¹		15 mL h ⁻¹		60 mL h ⁻¹	
		W1	W2	W1	W2	W1	W2
Primär-metabolismus	Glukoseverbrauch in nmol h ⁻¹ 10 ⁻⁶	20	60	20	50	10	80
	Laktatbildung in nmol h ⁻¹ 10 ⁻⁶	4	10	4	8	4	10
	Harnstoffsynthese in nmol h ⁻¹ 10 ⁻⁶	60	25	70	35	35	10
	Albuminsekretion in µg h ⁻¹ 10 ⁻⁶	0,25	0,06	0,3	0,1	0,13	0,03
	LDH-Freisetzung in mU h ⁻¹ 10 ⁻⁶	1	0,02	1,3	0,02	1,6	0,02
	Zellaustrag in %	3	5	3	5	3	5
Bio-transformation	ECOD-Aktivität in pmol h ⁻¹ 10 ⁻⁶	40	20	20	20	30	20
	EROD-Aktivität in pmol h ⁻¹ 10 ⁻⁶	15	15	8	8	13	13
	UGT-Aktivität in nmol h ⁻¹ 10 ⁻⁶	2	4	2,5	3	3	3,5
	ST-Aktivität in nmol h ⁻¹ 10 ⁻⁶	1	4	1,5	1,5	0,5	0,5

Der Einfluss einer Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit von 7,5 mL h⁻¹ auf 15 und 60 mL h⁻¹ auf die biochemische Leistung der Leberzellkultur ist in Tab. 5-1 dargestellt. Die Strömungsgeschwindigkeit hat im getesteten Bereich kaum Einfluss auf den Glukose- und Laktat-Metabolismus von primären porcinen Leberzellen. Eine Strömungsgeschwindigkeit von 15 mL h⁻¹ erhöht aber im Vergleich zu einer Strömungsgeschwindigkeit von 7,5 mL h⁻¹ die Harnstoffsynthese und die Albuminsekretion, beides wichtige Indikatoren für einen intakten Energiestoffwechsel und die Vitalität der Leberzellkultur. Der weitere Anstieg der Strömungsgeschwindigkeit auf 60 mL h⁻¹ führt hingegen bei beiden Parametern zu einer deutlichen Abschwächung.

In dem untersuchten Bereich führt ein Anstieg der Strömungsgeschwindigkeit weder zu einer verstärkten Freisetzung von LDH noch zu einem erhöhten Zellaustrag. Während bei der Biotransformation eine Strömungsgeschwindigkeit von 7,5 mL h⁻¹ in der zweiten Woche zu höheren Enzymaktivitäten führt, erscheinen diese vor allem bei 15 mL h⁻¹ stabiler. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Standardabweichungen bei den Daten zur Biotransformation sehr hoch sind.

5.2.4 Einfluss der Zelldichte

Bei der Kultivierung von adhärennten Zellen sind Zell-Zell-Kontakte für den Erhalt differenzierter Zellen von großer Bedeutung (Sajiki 2000). Zu hohe Zelldichten führen aber zu Limitierungen durch Substrate und Produkte und verschlechtern somit die Versorgung der Zellen. Um die optimale Zelldichte zu ermitteln, wurden drei verschiedene getestet: 2×10^7 , 4×10^7 und 6×10^7 mL^{-1} , die den Gesamtzellzahlen 5×10^7 , 10×10^7 und 15×10^7 entsprechen. Bei den Kultivierungen wurde die zellspezifische Mediummenge konstant gehalten.

Tab. 5-2: Einfluss der Zelldichte von 2×10^7 , 4×10^7 und 6×10^7 mL^{-1} auf die Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten im Oxy-HFB in der ersten (W1) und zweiten (W2) Woche in Kultur.

	Parameter	2×10^7 mL^{-1}		4×10^7 mL^{-1}		6×10^7 mL^{-1}	
		W1	W2	W1	W2	W1	W2
Primär-metabolismus	Glukoseverbrauch in $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$	20	60	20	35	25	30
	Laktatbildung in $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$	4	10	5	10	5	11
	Harnstoffsynthese in $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$	60	25	40	35	30	25
	Albuminsekretion in $\mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$	0,25	0,06	0,25	0,3	0,15	0,2
	LDH-Freisetzung in $\text{mU h}^{-1} 10^{-6}$	1	0,02	1,8	0,04	1,8	0,03
	Zellaustrag in %	3	5	6	7	6	7
Bio-transformation	ECOD-Aktivität in $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$	40	20	30	30	5	10
	EROD-Aktivität in $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$	15	15	8	10	10	10
	UGT-Aktivität in $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$	2	4	1,5	2	1,5	2
	ST-Aktivität in $\text{nmol h}^{-1} 10^{-6}$	1	4	1,5	1	0,2	0,5

Tab. 5-2 zeigt den Einfluss einer Erhöhung der Zelldichte von 2×10^7 mL^{-1} auf 4 bzw. 6×10^7 mL^{-1} . Höhere Zelldichten stabilisieren die Zellkultur im Oxy-HFB: Glukoseverbrauch, Laktatbildung, Harnstoffsynthese und Albuminproduktion sind deutlich stabiler als bei einer Zellzahl von 2×10^7 mL^{-1} . Vor allem in der zweiten Woche in Kultur sind die Harnstoffsynthese und die Albuminsekretion bei Zelldichten von 4 und 6×10^7 mL^{-1} höher als bei 2×10^7 mL^{-1} .

In den ersten beiden Tagen wird in Bioreaktoren mit 4 und 6×10^7 mL^{-1} eine doppelt so hohe LDH-Aktivität gemessen wie in den Bioreaktoren mit 2×10^7 mL^{-1} . Am ersten Kulturtag steht

den Zellen in allen Bioreaktoren die gleiche Menge an Medium (2,5 mL) zur Verfügung, so dass Limitationen bei höheren Zelldichten wahrscheinlich sind. Ab dem 4. Tag sind kaum Unterschiede in der LDH-Aktivität festzustellen. Am Tag nach der Isolation werden ca. 3 % der Zellen bei einer Zelldichte von $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ und ca. 6 % bei höheren Zelldichten ausgetragen. Der größere Zellaustrag ist experimentell bedingt, da bei hohen Zelldichten bei der Aufgabe der Zellen nicht alle in das Bioreaktorinnere gelangen, ein Rest der Zellen bleibt im Schlauchvolumen und wird beim ersten Mediumwechsel sofort wieder ausgetragen.

Die Phase I-Enzyme EROD und ECOD sind bei allen Zelldichten aktiv, die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelldichten werden besonders in der zweiten Kultivierungswoche kleiner. Die Phase II-Enzyme UGT und ST sind hingegen bei einer Zellzahl von 5×10^7 aktiver, jedoch gleichen sich die Werte bei UGT in der zweiten Woche einander an. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln festgestellt wurde, liegt auch hier eine hohe Standardabweichung bei den Enzymaktivitäten vor.

5.3 Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB

Nachdem gezeigt wurde, dass die Kultivierung von primären Zellen im Oxy-HFB gut durchführbar ist, sollte nun auch die Möglichkeit zur Expansion von Zellen betrachtet werden. Deshalb wurden je $1,8 \times 10^6$ Zellen (HepG2) in drei Bioreaktoren gegeben und über einen Zeitraum von acht Wochen in Kultur gehalten. Als Kontrolle dienten 75 cm²-Zellkulturflaschen, in die HepG2 mit der gleichen Zellzahl eingesät wurde. Die Kultivierung der Kontrolle wurde nach drei Wochen abgebrochen, da sowohl die mikroskopische als auch die biochemische Kontrolle ergab, dass keine lebenden Zellen mehr vorlagen. Optimale Kultivierungsbedingungen lagen etwa bis zum 11. Tag in Kultur vor.

5.3.1 Biochemie

Glukose:

In Abb. 5-19 ist der Glukoseverbrauch bei der Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Die Glukoseverbrauchsrate liegt am ersten Tag bei $8,9 \mu\text{mol h}^{-1}$ im Oxy-HFB und bei $18 \mu\text{mol h}^{-1}$ in der Kontrolle (dritter Tag). Der maximale

Verbrauch liegt am 37. Tag im Oxy-HFB mit etwa $250 \mu\text{mol h}^{-1}$, was einer Zunahme um den Faktor 28,1 entspricht.

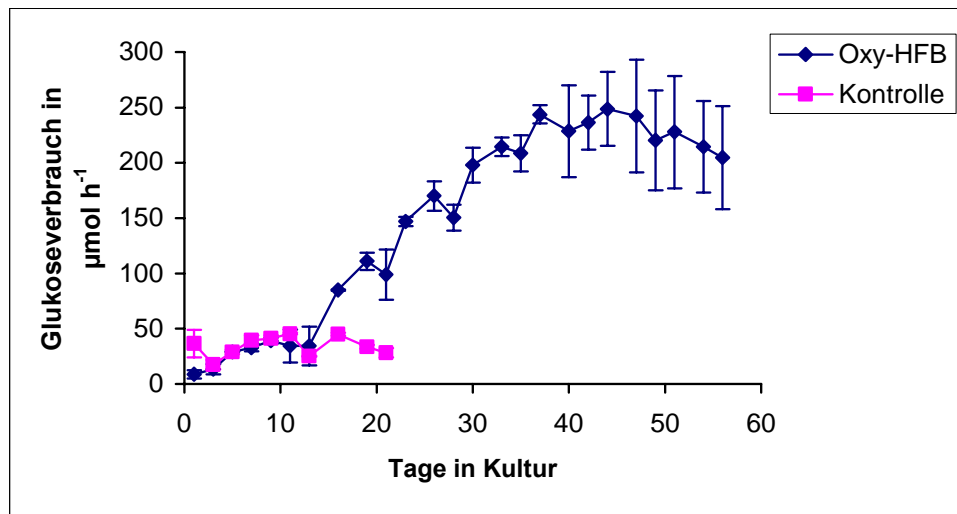


Abb. 5-19: Glukoseverbrauch bei der Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB im Vergleich zur Kontrolle.

Laktat:

Die Bildung von Laktat ist in Abb. 5-20 gezeigt. Der Kurvenverlauf ist dem des Glukoseverbrauchs sehr ähnlich. Am ersten Tag beträgt die Laktatbildung im Oxy-HFB $7,6 \mu\text{mol h}^{-1}$ und in der Kontrolle $10,5 \mu\text{mol h}^{-1}$. Bis zum 11. Tag ist der Kurvenverlauf bei Oxy-HFB und Kontrolle relativ ähnlich (etwa 50 bzw. 40 $\mu\text{mol h}^{-1}$ am 10. Tag). Die maximale Laktatkonzentration wird am 44. Tag mit $383 \mu\text{mol h}^{-1}$ gemessen, das entspricht einer Zunahme um das 50-fache.

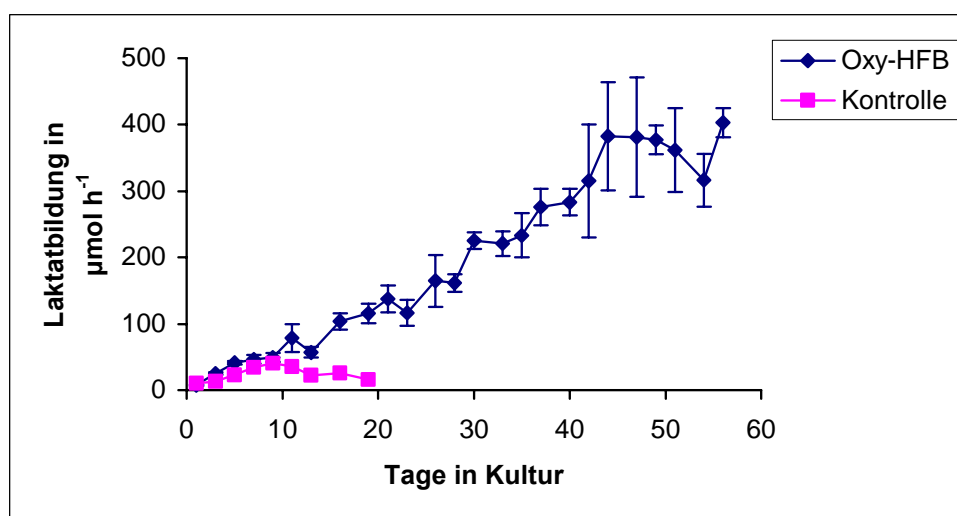


Abb. 5-20: Laktatbildung bei der Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB im Vergleich zur Kontrolle.

Albumin:

Abb. 5-21 zeigt die Albuminsekretion bei der Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB im Vergleich zur Kontrolle. Am ersten Tag werden im Oxy-HFB $2,9 \mu\text{g h}^{-1}$ und in der Kontrolle $6,8 \mu\text{g h}^{-1}$ Albumin produziert. Bis zum 11. Tag erhöht sich die Albuminsekretion auf $53 \mu\text{g h}^{-1}$ im Oxy-HFB und $30 \mu\text{g h}^{-1}$ in der Kontrolle. Die höchste Albuminsekretion im Bioreaktor liegt bei ca. $150 - 200 \mu\text{g h}^{-1}$. Legt man wegen der großen Schwankungen eine maximale Albuminsekretion von nur $150 \mu\text{g h}^{-1}$ zugrunde, ergibt sich im Oxy-HFB eine Zunahme um das 51,7-fache während der Kultivierungsdauer.

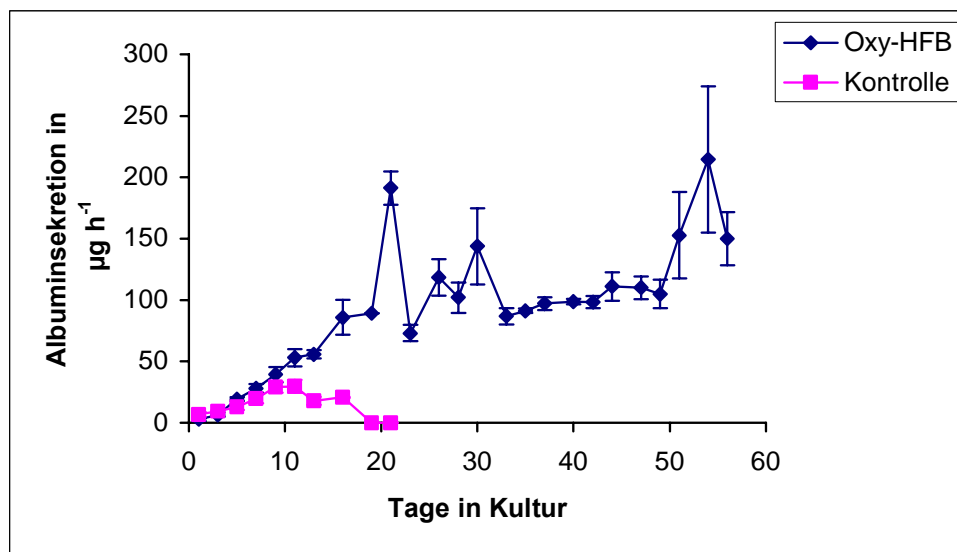


Abb. 5-21: Albuminsekretion bei der Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB im Vergleich zur Kontrolle.

LDH:

In Abb. 5-22 ist die LDH-Aktivität im Mediumüberstand dargestellt. Bei der Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB nimmt die Aktivität von LDH über den Kultivierungszeitraum zu. Am Tag nach der Zellaufgabe beträgt die Aktivität im Oxy-HFB $0,005 \text{ U h}^{-1}$ und in der Kontrolle $0,006 \text{ U h}^{-1}$. Bis zum 11. Tag nimmt die LDH-Aktivität im Mediumüberstand im Oxy-HFB auf $0,038 \text{ U h}^{-1}$ und in der Kontrolle auf $0,022 \text{ U h}^{-1}$ zu. Die Kultur im Oxy-HFB führt zu einer maximalen LDH-Aktivität am 56. Tag von $0,861 \text{ U h}^{-1}$, was einem Anstieg der Aktivität um den Faktor 22,7 entspricht.

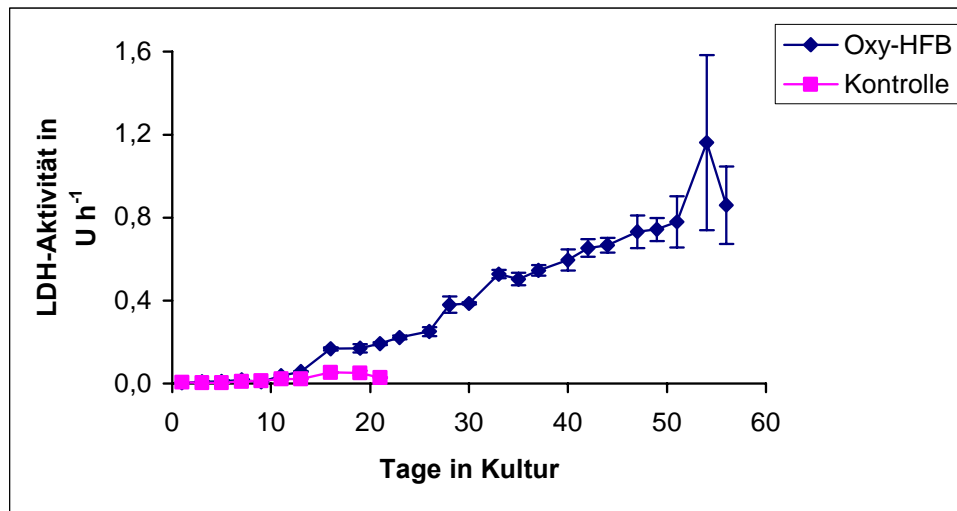


Abb. 5-22: LDH-Aktivität im Medium bei der Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB im Vergleich zur Kontrolle.

Zellzahl:

Am Tag 0 wurden je $1,8 \times 10^6$ Zellen in die Bioreaktoren und Kontrollen (75 cm²-Zellkulturflaschen) gegeben. Die Proteinbestimmung in der Kontrolle am 21. Tag ergab eine Zellzahl von $(9,3 \pm 0,9) \times 10^6$, in den Bioreaktoren wurde am 56. Tag eine Zellzahl von $(253 \pm 35) \times 10^6$ ermittelt. Das entspricht einer Zunahme um den Faktor 5,2 in der Kontrolle und um den Faktor 140 in den Bioreaktoren. Die resultierende Zelldichte im Bioreaktor betrug somit $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ am Ende des Kultivierungszeitraums.

5.3.2 Zusammenfassung

Im Oxy-HFB können HepG2-Zellen ausgesät und anschließend innerhalb von 5 – 8 Wochen bis auf eine Zelldichte von $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ expandiert werden. Dabei zeigen sich in den untersuchten biochemischen Parametern keine Beeinträchtigungen im Vergleich zur Kontrolle, bei der allerdings bereits nach elf Tagen keine optimalen Kultivierungsbedingungen vorlagen und die nach drei Wochen verworfen werden musste.

Zusätzlich hat dieser Versuch gezeigt, dass das Kultivierungssystem Oxy-HFB über einen Zeitraum von acht Wochen zuverlässig funktioniert.

6 Diskussion

Verschiedene Kultursysteme wurden entwickelt, um das Problem des Funktionsverlusts von Leberkulturen in Bioreaktoren zu lösen. Bis heute gibt es kein geometrisch definiertes und zugleich einfaches Bioreaktorsystem, das eine unabhängige Oxygenierung bietet, kurze Diffusionsstrecken für Substrate und Metabolite ermöglicht und somit bei hohen Zelldichten die Kultivierung differenzierter Leberzellen erlaubt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Funktionsprüfung eines oxygenierenden Hohlfaserreaktors (Oxy-HFB) zur Kultivierung von Leberzellen. Es wurde der Oxy-HFB entwickelt, der eine direkte Oxygenierung der Zellen durch die Hohlfasermembran ermöglicht und durch die geringen Abstände zwischen den Hohlfasern Diffusionsstrecken minimiert.

6.1 Optimierung des Kultivierungssystems

6.1.1 Vergleich des Oxy-HFB mit dem Quadrox

Glukose und Laktat:

Glukose stellt eine der Hauptenergiequellen für tierische Zellen dar. In primären Zellen findet eine Oxidation der Glukose im Cytosol bis zum Pyruvat statt (siehe Abb. 6-1), das anschließend in den Mitochondrien vollständig zu CO_2 und H_2O oxidiert wird (Löffler und Petrides 1998). Abhängig von den Kultivierungsbedingungen geht der native Zustand der Zellen während der Kultivierung verloren.

Kontinuierliche Säugerzelllinien zeichnen sich durch einen Primärenergiemetabolismus aus, bei dem die konsumierte Glukose nur unvollständig oxidiert wird. Dadurch kommt es zu einem übermäßig hohen Bedarf an Energiequellen sowie der Produktion von toxisch wirkenden Nebenprodukten wie Laktat und Ammonium. Untersuchungen haben gezeigt, dass der Übergang der glykolytischen Intermediate in den Citratzyklus aufgrund fehlender Aktivität der entsprechenden Verbindungsenzyme Pyruvatdehydrogenase-Komplex, Pyruvat-Carboxylase und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase unterbunden ist (Fitzpatrick et al 1993, Neermann und Wagner 1996).

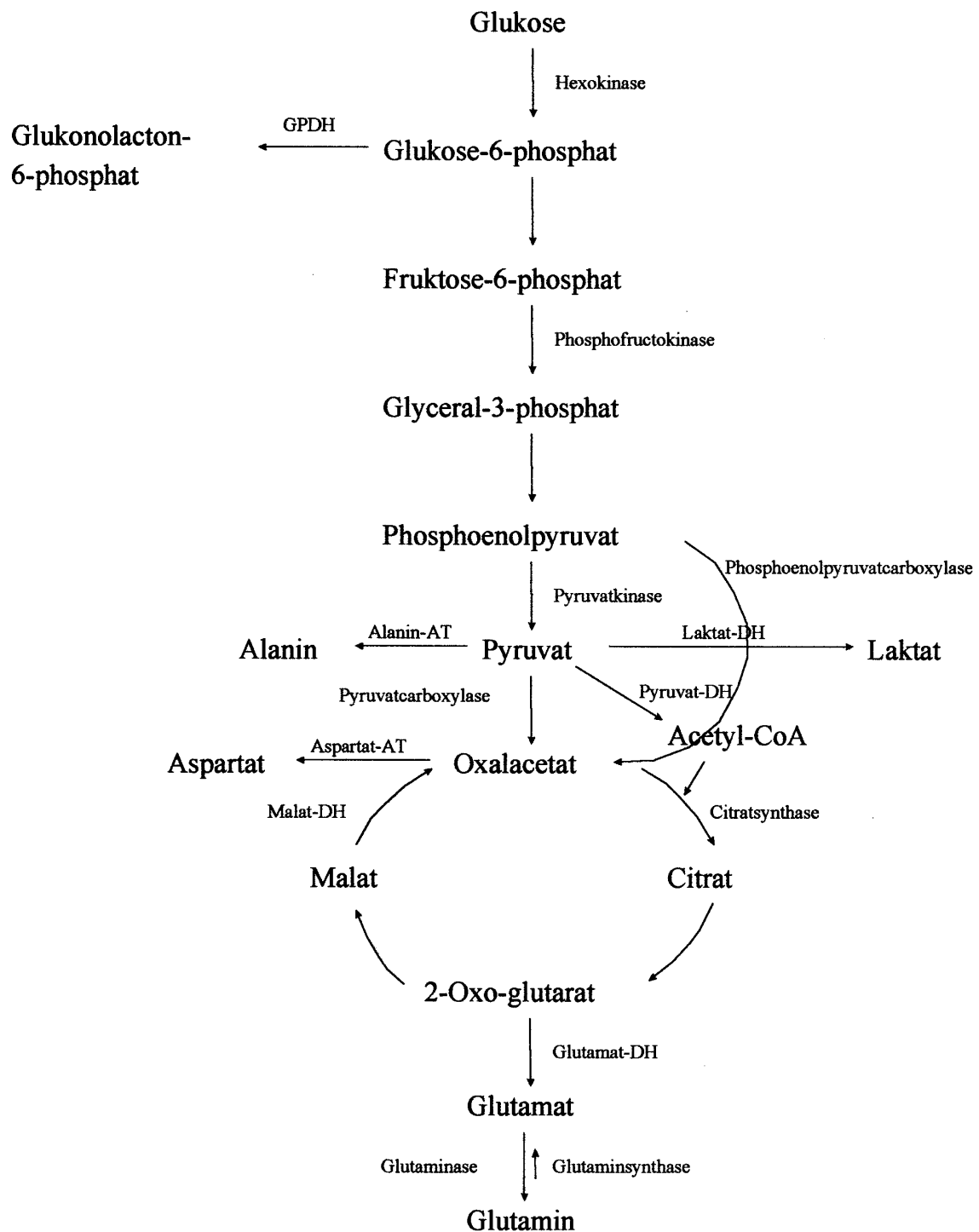


Abb. 6-1: Darstellung einiger wichtiger Stoffwechselwege von Glukose und Glutamin. AT Aminotransferase, DH Dehydrogenase.

In primären Zellen wird Pyruvat vom Pyruvatdehydrogenase-Komplex zu Acetyl-CoA decarboxyliert, das anschließend mit Oxalacetat zu Citrat kondensiert wird. Damit wird der erste Schritt des Citratzyklus eingeleitet. In einer weiteren Reaktion wandelt die Pyruvat-

Carboxylase einen Teil des gebildeten Pyruvats zu Oxalacetat um und füllt den Citratzyklus immer wieder mit neuen Intermediaten auf. Diese Reaktion ist ebenso wichtig wie die Einführung des Pyruvats in den Citratzyklus, da aus dem Pool der Citratzyklusintermediate ständig Moleküle für den Aufbau von Aminosäuren und Porphyrinen abgeführt werden (Löffler und Petrides 1998).

Die Basis für die Beurteilung des Metabolismus sind die stöchiometrischen Verhältnisse (Zeng und Deckwer 1998). Das molare Verhältnis von Laktatbildung zu Glukoseverbrauch wird zur Beurteilung von Zellkulturen oft herangezogen (Neermann und Wagner 1996, Zeng und Deckwer 1998). Ein hohes Verhältnis deutet auf eine Energiegewinnung aus der Glykolyse hin, bei der lediglich 2 mol ATP pro mol Glukose entstehen. Bei der oxidativen Phosphorylierung entstehen hingegen 38 mol ATP pro mol Glukose. Da aus 1 mol Glukose maximal 2 mol Laktat gebildet werden können, ergibt sich hiernach ein maximales stöchiometrisches Verhältnis von 2. Bei Säuger-Zelllinien wie z.B. BHK und CHO liegt das Verhältnis Laktatbildung zu Glukoseverbrauch bei mind. 1, in der Regel bei 1,3 – 1,6 (Neermann und Wagner 1996). Die Energie wird also fast ausschließlich durch aerobe Glykolyse gewonnen, die Zellen sind stark degeneriert. Untersuchungen an primären Rattenhepatozyten in der Sandwichkonfiguration (Petrishale) ergaben ein Verhältnis Laktatbildung zu Glukoseverbrauch kleiner als 1. Das Verhältnis war dabei stark abhängig von der Kulturdauer und der Sauerstoffsättigung des Mediums. Im Verlauf der zweiten Kulturwoche sank es auf etwa 0,3 – 0,5, bei sehr guten Sauerstoffbedingungen bis auf einen Wert von etwa 0,05 (Rocker 1999).

Die Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten im Quadrox (PP) führte zu einem stark schwankenden Verhältnis Laktatbildung zu Glukoseverbrauch von 1 – 2, während Kultivierungen im Quadrox (PMP) zu einem Verhältnis von nur 0,2 – 0,8 führten. Über den Kultivierungszeitraum waren keine Tendenzen zu erkennen. Während die Kultivierungen im Quadrox (PMP) somit zu einem ähnlichen Verhältnis Laktatbildung zu Glukoseverbrauch führt, wie von Rocker (1999) beschrieben, weicht das Verhältnis im Quadrox (PP) stark davon ab.

Das stöchiometrische Verhältnis von Laktatbildung zu Glukoseverbrauch bei Kultivierungen von primären porcinen Leberzellen im Oxy-HFB liegt zwischen 0,1 und 0,4 und scheint relativ unabhängig von den gewählten Kultivierungsbedingungen zu sein. Damit scheint abgesichert, dass die Zellen keine Glykolyse (weder aerobe noch anaerobe) zur primären Deckung des Energiehaushalts durchführen. In der Kontrolle wurden Leberzellen in der

Petrischale kultiviert. Das Verhältnis Laktatbildung zu Glukoseverbrauch betrug anfangs ca. 0,5 und stieg dann während der Kultivierung bis auf etwa 1 (maximal 1,8) an. Diese Daten decken sich etwa mit denen von Rocker (1999). Der Versuchsaufbau der Kontrolle führte zu einer Mediumschichtdicke von 1 mm und einer Collagenschichtdicke von 0,3 mm auf den Zellen, durch die der Sauerstoff diffundieren musste. Jensen et al (1976) haben für Schichtdicken von 1 mm bei der Kultivierung von Rattenhepatozyten gezeigt, dass Sauerstofflimitationen auftreten. Das deutlich niedrigere molare Verhältnis im Oxy-HFB weist somit auf eine bessere Sauerstoffversorgung als in der Petrischale hin.

Während das stöchiometrische Verhältnis der Laktatbildung zum Glukoseverbrauch bei Kultivierungen im Oxy-HFB kleiner ist, als bei Rocker (1999) angegeben, führten Kultivierungen im Quadrox zu größeren Verhältnissen, die zudem über den Kultivierungszeitraum stark schwankten. Bereits während der Kultivierung im Quadrox wurde offensichtlich, dass die Zellen nicht optimal verteilt waren. Zusätzlich ergab die Charakterisierung der Reaktoren (Kap. 4) Toträume im Quadrox, so dass die Zellen ungleichmäßig mit Substraten und Sauerstoff versorgt wurden. Dafür spricht ebenfalls, dass die Kultivierungen im Quadrox (PMP) zu einem geringeren Verhältnis von Laktatbildung zu Glukoseverbrauch führt als die im Quadrox (PP): Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden zuerst die Kultivierungen im Quadrox (PP) durchgeführt, die dabei gesammelten Erfahrungen führten zu einem optimierten Arbeitsablauf bei den Kultivierungen im Quadrox (PMP). Dadurch konnte die Verteilung der Zellen im Reaktor gleichmäßiger erfolgen und die Kultivierung verlief besser.

Für adulte Hepatozyten *in vivo* ist allerdings nicht Glukose der primäre Energielieferant, sondern Ketosäuren, die aus dem Abbau von Aminosäuren stammen (Löffler und Petrides 1998). Die Leber versorgt Muskeln und Gehirn mit Glukose und ist für die Aufrechterhaltung des optimalen Glukosespiegels zuständig. Dieser geringe Verbrauch konnte auch für adulte Hepatozyten in Kultur nachgewiesen werden (Bissell et al 1978). In der Regulation eines konstanten Blutglukosespiegels spielen die beiden Hormone der Bauchspeicheldrüse, Insulin und Glukagon, die wichtigste Rolle. Durch den Zusatz von Insulin und Glukagon in das Medium von Hepatozyten können *in vitro* leberspezifische Funktionen erhalten bleiben (Richman et al 1976, McGowan et al 1981). Unterschiede im Glukoseverbrauch sind in der hier vorgestellten Arbeit nicht durch variierende Insulin- oder Glukagonkonzentrationen bedingt, da überall das gleiche Medium verwendet wurde. Bei dem Vergleich mit Werten aus der Literatur müssen diese Unterschiede aber unbedingt berücksichtigt werden. Für glykolytische primäre porcine Hepatozyten wurden Glukoseverbrauchsdaten von

40 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ (Gerlach 1996) bis 225 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ (Rocker 1999) angegeben. Diese Verbrauchsdaten sind in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gefundenen Raten von 50 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ (Quadrox PP), 250 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ (Quadrox PMP), 70 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ (Oxy-HFB, Kontrolle) und 30 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ (Oxy-HFB, höhere Zelldichten).

Der Abbau von Glukose deckt in tierischen Zellen häufig nur einen geringen Teil des gesamten Energiebedarfs. Zusätzlich zur Glukose kann Glutamin mit einer Konzentration von 9 mM im Medium als Hauptenergiequelle dienen (Zielke et al 1984). Dadurch steigt das molare Verhältnis aus Laktatbildung und Glukoseverbrauch ebenfalls an, da weniger Glukose im Citratzyklus verbraucht wird. Neermann und Wagner (1996) haben gezeigt, dass die Glutamatdehydrogenase in primären porcinen Hepatozyten sehr aktiv ist, ebenso wie die Gegenspieler Glutaminase und Glutaminsynthase (Neermann und Wagner 1996, Watford et al 2002). Das abgebaute Glutamin kann zum Teil auch in Laktat konvertiert werden (Reitzer et al 1979, Zielke et al 1980), so dass auch hier ein externer Einfluss auf das Verhältnis Laktatbildung zu Glukoseverbrauch vorliegen kann. Leberzellen spielen eine große Rolle bei der Regelung des Glutaminhaushalts und stellen dies dem Organismus bei Bedarf zur Verfügung. Hepatozyten im periportalen Raum, also im sauerstoffreichen Blut, weisen eine hohe Glutaminase-Aktivität, Enzyme der Glukoneogenese und der Harnstoffsynthese auf, während im sauerstoffarmen Blut (perivenöser Raum) die Glutaminsynthase aktiver ist (Watford et al 2002, Häussinger et al 1992).

Harnstoff:

Eine hohe Harnstoffsynthese ist somit ebenfalls ein Parameter für eine gute Oxygenierung und weist zusätzlich auf einen intakten Energiestoffwechsel hin, da der Energiebedarf für die Bildung von Harnstoff hoch ist. Sowohl in der Kontrolle (60 – 90 nmol h⁻¹ 10⁻⁶) als auch in Kultivierungen im Quadrox (70 – 120 nmol h⁻¹ 10⁻⁶) und im Oxy-HFB (bis 120 nmol h⁻¹ 10⁻⁶) konnte eine hohe Harnstoffsynthese beobachtet werden. In der Literatur werden für primäre porcine Hepatozyten bei der Kultivierung in Bioreaktoren Harnstoffsynthesen zwischen 28 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ (Flendrig et al 1997a) und 63 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ (Gerlach 1996) angegeben. Rocker (1999) hat für die Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten in Petrischalen eine Harnstoffsynthese zwischen 60 und 110 nmol h⁻¹ 10⁻⁶ ermittelt. Somit stimmen die in der Literatur gefundenen Syntheseraten gut mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten überein. Unterschiede in der Harnstoffsynthese müssen trotzdem sehr kritisch betrachtet werden, da diese stark von dem angebotenen Stickstoff und somit den Mediumkomponenten abhängen.

Albumin:

Bei der Bewertung von Hepatozytenkulturen wird in der Regel die Fähigkeit, Albumin zu synthetisieren, als Qualitätsparameter herangezogen (Yanagi und Ohshima 2001, Sakai et al 1992, De Bartolo et al 2000). *In vivo* ist die Albuminsekretion im gesunden Organismus (Rothschild et al 1988) weitaus höher als im erkrankten (Annoni et al 1990). Rocker (1999) zeigte allerdings, dass die Albuminsynthese von einer Vielzahl von Parametern (Hormone, C-Quelle, Limitierungen bei Aminosäuren und Zuckern, dem Ammoniumgehalt und der Serumcharge) abhängig ist. Deshalb muss der „Qualitätsparameter“ Albuminsekretion zwar mit Vorsicht betrachtet werden, eine Vergleichbarkeit der Sekretionsraten ist aber im selben Labor unter Einsatz derselben Mediumkomponenten und bei Zellen derselben Hepatozytenisolation gegeben. Diese Voraussetzungen sind streng genommen nur für die Kultivierungen in den Oxy-HFBs und deren Kontrollen erfüllt, da die Zellen der Kultivierungen im Quadrox (PMP) nicht aus derselben Isolation stammten wie die im Quadrox (PP) oder der Kontrolle.

Für primäre Schweinehepatozyten werden in der Literatur Sekretionsraten für Albumin von $1,3 - 1,6 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ in der Sandwichkonfiguration (De Bartolo et al 2000, Rocker 1999) und $0,5 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ (Gerlach 1996) bis $0,8 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ (Naruse et al 1996b) im Bioreaktor angegeben. Die Sekretionsrate im Bioreaktor stimmt gut mit der bei Kultivierungen im Quadrox gefundenen Rate von $0,5 - 0,7 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ überein, ebenso wie die Sekretionsrate in der Kontrolle von etwa $1,4 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$ im Bereich der Literaturwerte für die Sandwichkonfiguration ist. Die Albuminsekretion im Oxy-HFB ist stark abhängig von den Kultivierungsbedingungen und beträgt maximal $1,3 \mu\text{g h}^{-1} 10^{-6}$. Somit können Leberzellkultivierungen im Oxy-HFB bei Einstellen der optimalen Versuchsbedingungen zu qualitativ gleichwertigen oder besseren Kulturen führen wie in der Sandwichkonfiguration.

Biotransformation:

Ein wesentlicher Parameter zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Hepatozyten ist die Biotransformationsaktivität. *In vivo* enthält die Leber ein breites Spektrum an Enzymen des Cytochrom P450-Systems (Phase I-Metabolismus) und des Phase II-Metabolismus. In der Kultur von Hepatozyten ist der rasche Abfall dieser Aktivitäten und Enzymmengen eine bekannte Tatsache, der durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen entgegengewirkt werden soll (Sirica und Pitot 1979, Thurman und Kauffman 1980).

Diazepam:

Zur Untersuchung des Cytochrom P450-Systems wurde bei Kultivierungen von primären Hepatozyten im Quadrox der Diazepam-Abbau untersucht. Dabei sind zwei alternative Zwischenprodukte, Temazepam und Nordazepam, möglich, die zu Oxazepam abgebaut werden (Zomorodi et al 1995). Untersuchungen mit primären porcinen Hepatozyten haben gezeigt, dass in der Regel der Abbau über Nordazepam als Zwischenprodukt dominiert (De Bartolo et al 2000, Karim et al 2000). Vilei et al (2001) wiesen nach, dass dieses nicht nur für porcine, sondern auch für humane und Rattenhepatozyten gilt. Unterschiede treten demnach nur in der Enzymaktivität auf, nicht aber in den Verhältnissen zwischen den Enzymaktivitäten. Inaba et al (1988) haben im humanen Lebersystem *in vivo* höhere Nordazepam-Konzentrationen als Temazepam-Konzentrationen gefunden, während *in vitro* das Temazepam überwog. Untersuchungen ergaben dabei Unterschiede in den Enzymaktivitäten, bestimmt durch die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} .

Kultivierungen im Quadrox ergaben ebenfalls höhere Temazepam- als Nordazepam-Konzentrationen, so dass hier auch auf Kultivierungsbedingungen geschlossen werden könnte, die der *in vivo*-Situation nicht besonders nahe kommen. Es muss aber berücksichtigt werden, dass Nordazepam und Diazepam eine sehr viel schlechtere Wasserlöslichkeit aufweisen als Temazepam und Oxazepam (Hooper et al 1992). Es kann also angenommen werden, dass Nordazepam viel besser am Hohlfasermaterial adsorbiert und somit weniger Nordazepam im Mediumüberstand nachgewiesen werden kann.

Die niedrigste Metabolitkonzentration wurde beim Oxazepam gefunden, welches das Endprodukt des durch das Cytochrom P450-Systems katalysierten Metabolismus darstellt. Es ist aber bekannt, dass Oxazepam sehr schnell glukuronidiert wird (St-Pierre und Pang 1995, Karim et al 2000) und somit nicht mehr nachgewiesen wird. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass Temazepam und Nordazepam glukuronidiert und daher nicht mehr zu Oxazepam metabolisiert werden (St-Pierre und Pang 1995). Es ist auf jeden Fall als positives Zeichen für die Kultivierung von primären Leberzellen zu werten, dass alle drei Metabolite nachgewiesen werden können.

Durch die Adsorptionsprozesse im Quadrox ist die Auswertung der erhaltenen Daten deutlich erschwert. Die Versuche mit BR-Kontrollen ohne Zellen zeigen, dass am 8. Tag maximal 5 % des eingesetzten Diazepams im Quadrox (PP) und 2,5 % im Quadrox (PMP), am 22. Tag maximal 17 % im Quadrox (PP) und 7,5 % im Quadrox (PMP) wiedergefunden werden.

Abhängig von der Kultivierungsdauer tritt in den Hohlfasern eine Sättigung der Adsorption auf, obwohl zwischen den 24-stündigen Inkubationen jeweils sechs Tage mit serumfreien Medium „gewaschen“ wird. Zusätzlich treten durch die besondere Kultivierungsform im kontinuierlichen Betrieb mit Rezirkulation weitere Effekte auf: Während der Inkubationsphase wird Diazepam-haltiges Medium aus der Zufütterungsflasche in den Bioreaktor gegeben, der anfangs kein Diazepam enthält. Durch die Rezirkulation wird das Diazepam-freie Medium mit dem Diazepam-haltigen Medium vermischt. Eine Berechnung der Diazepam-Konzentration im Reaktor unter der Annahme, dass die Vermischung nur an der Zuführung des frischen, mit Diazepam-versetzten Mediums erfolgt, ergab nach 24 h eine maximale Konzentration von 66 % der eingesetzten Diazepam-Konzentration.

EROD und ECOD:

Die Aktivität des Cytochrom P450-Systems bei der Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten im Oxy-HFB wurde anhand der Aktivität der Monooxygenasen ECOD und EROD beurteilt. Die ECOD-Aktivität wird von mindestens zehn verschiedenen CYPs in der Ratte (1A1/1A2, 2A1, 2B1/2, 2C6/7, 2C11, 2C13 und 2E1) und im Menschen (1A1/2, 2B6 und 2E1) ausgeführt, es treten aber große speziesspezifische Unterschiede auf (Kern 1997, Donato et al 1999). Für porcine Leberzellen wird eine ECOD-Aktivität durch CYP 2B1/2 angenommen, genauere Erkenntnisse liegen zur Zeit aber noch nicht vor (Donato et al 1999). Die Aktivität von EROD wird im wesentlichen von den CYPs 1A1 und 1A2 katalysiert und weist nur geringe speziesspezifische Differenzen auf (Kern et al 1997, Grant und Hawksworth 2000, Bhandari et al 2001).

Behnia et al (2000) geben für die Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten im Monolayer auf einer Collagenschicht eine ECOD-Aktivität von $480 - 1080 \text{ pmol h}^{-1} 10^{-6}$ über einen Zeitraum von acht Tagen an. Langsch und Bader (2001) ermittelten für die Kultivierung von porcinen Hepatozyten im Flachmembranbioreaktor (Sandwichkonfiguration) eine ECOD-Aktivität zwischen $300 \text{ und } 900 \text{ pmol h}^{-1} 10^{-6}$, die somit ebenfalls deutlich höher ist, als die in der Kontrolle dieser Arbeit ermittelte Aktivität von $60 - 240 \text{ pmol h}^{-1} 10^{-6}$. Die Ursachen hierfür sind vielfältig: Die Arbeiten wurden zwar im selben Labor durchgeführt, aber es wurden Zellen aus unterschiedlichen Isolationen, verschiedene Inkubationszeiten (1 h bzw. 4 h) und andere Substratkonzentrationen ($50 \text{ }\mu\text{M}$ bzw. $30 \text{ }\mu\text{M}$) verwendet. Bekannt ist, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit zu einer Verringerung der Enzymaktivität führt: Erhöht man die Inkubationszeit von 1 h auf 4 h, so wird die Aktivität etwa halbiert; ein Erniedrigen der Substratkonzentration von $50 \text{ }\mu\text{M}$ auf $30 \text{ }\mu\text{M}$ führt zu einem Aktivitätsverlust von etwa

20 % (Langsch und Bader 2001). Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass Langsch und Bader eine resultierende Substratkonzentration angegeben haben, die den Verdünnungseffekt durch die Collagenschicht des Sandwich berücksichtigt. Die aufgegebene Substratkonzentration betrug somit 70 μM anstelle von 50 μM . Diese Untersuchungen zeigen, dass ein Vergleich der Enzymaktivitäten nur mit sehr großer Vorsicht durchzuführen ist, da kleine Änderungen in der Versuchsdurchführung bereits große Änderungen in den Aktivitäten zur Folge haben. Ein interner Vergleich in einer Versuchsreihe erscheint somit die einzige reelle Alternative, solange die Versuchsbedingungen nicht standardisiert sind.

Ähnliches lässt sich auch für die Aktivität von EROD feststellen. Langsch und Bader (2001) haben eine Aktivität von etwa 180 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$ ermittelt, während in der Kontrolle eine Aktivität von maximal 84 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$ gefunden wird. Die längere Inkubationszeit von 4 h im Vergleich zu 1 h bei Langsch und Bader führt zu einer auf 40 % reduzierten Aktivität. Die Substratkonzentration wurde in beiden Fällen mit 70 μM angegeben, Langsch und Bader haben aber wegen der Verdünnungseffekte durch die Collagenschicht 98 μM aufgegeben. In dem Konzentrationsbereich steigt durch die Erhöhung der Substratkonzentration um 40 % die Aktivität um ca. 10 – 20 %. Berücksichtigt man die verschiedenen Einflussfaktoren, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung der Daten. Joly et al (1997) wiesen am 4. Tag in Kultur eine EROD-Aktivität von 300 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$ in Kulturen von primären porcinen Hepatozyten in der Sandwichkonfiguration und immobilisiert in Alginat nach. Im Gegensatz dazu fanden Behnia et al (2000) in Schweinehepatozyten, die als Monolayer auf einer Collagenschicht kultiviert wurden, nur eine EROD-Aktivität von 60 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$, die innerhalb von wenigen Tagen nicht mehr nachweisbar war.

Vergleicht man hingegen die Aktivitäten von EROD und ECOD in der Kontrolle mit denen im Oxy-HFB, so stellt man größere Diskrepanzen fest: Die maximale ECOD-Aktivität im Oxy-HFB beträgt 110 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$, ist in der Regel aber nicht höher als 60 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$ am zweiten Tag in Kultur und 35 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$ am 14. Tag. In der Kontrolle wird am zweiten Tag hingegen eine Aktivität von 240 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$ und am 14. Tag von 60 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$ gemessen. Hier sind also deutliche Unterschiede zwischen Kontrolle und Oxy-HFB festzustellen. Betrachtet man die EROD-Aktivität, so sind die Unterschiede hier nicht ganz so groß: In der Kontrolle wird am zweiten Tag eine Aktivität von 84 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$ detektiert, die während der Kultivierung bis auf 41 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$ abnimmt. Die höchste gemessene Aktivität im Oxy-HFB beträgt etwa die Hälfte mit 48 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$ und 22,5 $\text{pmol h}^{-1} 10^{-6}$.

Wie schon beim Quadrox müssen die Adsorptionsprozesse auch im Oxy-HFB berücksichtigt werden. Es gibt mehrere Anhaltspunkte für einen entscheidenden Einfluss der Adsorption:

1. Das Substrat Ethoxyresorufin ist eine gelbe Substanz, die ganz offensichtlich während der vierstündigen Inkubationszeit die Hohlfasern und Schläuche anfärbt, während dies bei der Kontrolle in der Collagenschicht nicht zu beobachten war. 2. Es ist bekannt, dass sowohl die Substrate als auch die Metabolite schlecht wasserlöslich sind und von daher leicht adsorbieren. 3. Die Inkubation mit Ethoxyresorufin erfolgte direkt nach der Inkubation mit Ethoxycoumarin in denselben Bioreaktoren, so dass die Hohlfasern durch das Ethoxycoumarin bereits vorgesättigt waren, was in einer höheren Aktivität für EROD zum Ausdruck kommt. Versuche in der Petrischale zeigten bei einem Vergleich der EROD-Aktivität mit und ohne vorherige Inkubation mit Ethoxycoumarin keine Unterschiede in der Aktivität von EROD.

UGT und ST:

Die Phase II-Aktivität bei der Kultivierung von primären porcinen Hepatozyten wird durch die Kopplung des Substrats 4-Methylumbelliferon (4-MU) mit Glucuronsäure durch die UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) oder mit Schwefelsäure durch die Sulfotransferase (ST) überprüft. Da beide Enzyme UGT und ST das Substrat 4-MU metabolisieren entsteht eine Konkurrenzreaktion, die einen Einfluss auf die ermittelten Aktivitäten hat. Sowohl für die Ratte (Suolinna und Pitkaranta 1986, Grant und Hawksworth 1986) als auch für den Menschen (Koebe et al 1994) wurde eine Abnahme der ST-Aktivität über den Kultivierungszeitraum bei gleichzeitiger Zunahme der UGT-Aktivität gefunden. In humanen Leberschnitten (Vandenbranden et al 1998) und bei der Kultivierung porciner Leberzellen (Langsch und Bader 2001) konnte eine stabile UGT-Aktivität und eine Abnahme bzw. Stabilität der ST-Aktivität innerhalb der Kultivierungszeit festgestellt werden.

Langsch und Bader (2001) fanden im Flachmembranreaktor (Sandwichkonfiguration) eine UGT-Aktivität von $13,3 - 16,8 \mu\text{mol h}^{-1} 10^{-6}$ und eine ST-Aktivität von etwa $4,8 \mu\text{mol h}^{-1} 10^{-6}$. Dafür wurden $140 \mu\text{M}$ 4-MU (um unter Berücksichtigung der Collagenschicht eine Konzentration von $100 \mu\text{M}$ zu erhalten) für 1 h auf den Zellen inkubiert. In dieser Arbeit wurde die Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ 4-MU ohne Berücksichtigung eventueller Verdünnungseffekte für 4 h inkubiert. Dabei ergeben sich maximale UGT-Aktivitäten von $13,8 \mu\text{mol h}^{-1} 10^{-6}$ und maximale ST-Aktivitäten von $2,2 \mu\text{mol h}^{-1} 10^{-6}$ in der Kontrolle.

Wie auch schon bei den Phase I-Enzymen ECOD und EROD haben die Kultivierungsdauer und Substratkonzentration einen erheblichen Einfluss auf die resultierende Enzymaktivität und ebenfalls auf das Verhältnis der Enzymaktivitäten untereinander. Die Aktivitäten der

beiden Enzyme unterscheiden sich in ihrer Zeitabhängigkeit sehr stark voneinander. Während die Aktivität von ST mit zunehmender Zeit immer geringer wird, nimmt die Aktivität von UGT bis zu einer Inkubationszeit von 2 h zu und bleibt dann in etwa konstant. Bei steigender Substratkonzentration (10 – 200 μM) nimmt die UGT-Aktivität ebenfalls zu, während die ST-Konzentration etwa konstant bleibt (Langsch und Bader 2001). Die von Langsch und Bader bestimmten UGT-Aktivitäten sind geringfügig höher und die ST-Aktivitäten sind doppelt so hoch wie in der Kontrolle, was gut mit den beschriebenen Zeit- und Substratabhängigkeiten übereinstimmt.

Vergleicht man die UGT-Aktivitäten von $13,8 \mu\text{mol h}^{-1} 10^{-6}$ und ST-Aktivitäten von $2,2 \mu\text{mol h}^{-1} 10^{-6}$ der Kontrolle mit den maximal gefundenen Aktivitäten für UGT von $8,8 \mu\text{mol h}^{-1} 10^{-6}$ und für ST von $4,8 \mu\text{mol h}^{-1} 10^{-6}$ im Oxy-HFB, so erkennt man große Unterschiede, die zum Teil aber auf die sehr großen Standardabweichungen zurückzuführen sind. Die Substratkonzentration von 4-MU im Mediumüberstand nimmt sowohl in der Kontrolle (15 %) als auch in den Oxy-HFBs (15 – 50 %) stark ab, so dass trotz der Unsicherheit bei den Metabolitkonzentrationen von dem Vorhandensein der Phase II-Aktivität ausgegangen werden kann.

Zur Abschätzung der Adsorptionsprozesse im Oxy-HFB wurde 4-MU für 4 h in Bioreaktoren ohne Zellen inkubiert. Dabei wurde im Oxy-HFB ohne Schlauchperipherie zwischen 77 % am zweiten Tag und 81 % am 14. Tag des eingesetzten Substrats wiedergefunden. Mit Zufügen der Schlauchperipherie und Erhöhung des Schlauchvolumens konnte die Wiederfindungsrate bis auf 96 % am 14. Tag erhöht werden. Auf den ersten Blick ist dieses Ergebnis im Vergleich zu den Versuchen mit Diazepam im Quadrox (PMP) überraschend, da dort maximal 7,5 %, wenn man die Verdünnungseffekte durch die Art der Kultivierung berücksichtigt etwa 11 % wiedergefunden werden. Es werden zwar in beiden Reaktorsystemen dieselben Hohlfasern verwendet, aber es gibt auch einige entscheidende Unterschiede: Verschiedene Substanzen (Diazepam im Quadrox, 4-MU im Oxy-HFB) können ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten aufweisen, die Prozesse bei der Adsorption sind zeitabhängig (24 h im Quadrox, 4 h im Oxy-HFB) und durch die unterschiedliche Bauform ergibt sich ein anderes Oberflächen-Volumen-Verhältnis in den Reaktoren ($96 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ im Quadrox, $60 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ im Oxy-HFB).

Fazit:

Für beide Reaktorsysteme konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von differenzierten primären Leberzellen über den untersuchten Zeitraum von 2 – 3 Wochen möglich ist. Das stöchiometrische Verhältnis von Laktatbildung zu Glukosebildung deutet allerdings daraufhin, dass die Zellen im Oxy-HFB bezüglich des Primärenergiemetabolismus besser erhalten sind. Zudem scheint es schwieriger zu sein, im Quadrox die Zellen unter konstanten Bedingungen zu kultivieren. Die Daten der Biotransformation lassen sich in beiden Systemen nur schwer auswerten, da Adsorptionsprozesse unterschiedliche Einflüsse ausüben. Eine Analyse der Daten zu den Kultivierungen im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Charakterisierung der Reaktorsysteme ergibt somit eine Überlegenheit des Oxy-HFB zur Kultivierung von primären Leberzellen.

6.1.2 Variation der Kultivierungsbedingungen im Oxy-HFBMediumvolumen:

Wenig Beachtung wird bei der Untersuchung von Leberkultivierungssystemen dem zur Verfügung stehendem Mediumvolumen pro Zellzahl geschenkt. Dabei gilt allgemein für jede Zellkultur, dass Substratlimitationen oder Produktinhibitionen auftreten können. Die Aufgabe der Leber ist es aber, konstante Konzentrationen aufrecht zu erhalten. Somit können bei qualitativ gleichwertigen Zellen abhängig vom zur Verfügung stehenden Mediumvolumen unterschiedliche Synthese- und Verbrauchsrate erwartet werden.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit das Mediumvolumen im Verhältnis von 0,05, 0,25 und 1 mL 10^{-6} untersucht, in der Kontrolle lag ein Verhältnis von 1 mL 10^{-6} vor. Bei einigen Parametern konnten große Unterschiede in Abhängigkeit vom Mediumvolumen festgestellt werden, bei anderen gab es dagegen keine Veränderungen. So hat das zur Verfügung gestellte Medium bei den durchgeführten Kultivierungen kaum den Glukoseverbrauch oder die Laktatbildung beeinflusst, bei der Harnstoffsynthese und der Albuminsekretion, wichtige Qualitätsparameter für eine Hepatozytenkultur, konnte hingegen ein großer Einfluss gemessen werden. Während Kultivierungen mit 0,05 - 0,25 mL 10^{-6} zu deutlich geringeren Syntheseraten führten, ergaben Mediumverhältnisse von 1 mL 10^{-6} ähnliche Syntheseraten wie in der Kontrolle. Leberzellen, die mit 0,05 mL 10^{-6} kultiviert wurden, scheinen sehr schnell ihre Leistungsfähigkeit zu verlieren, während dies bei 0,25 mL 10^{-6} erst in der zweiten Woche in Kultur offensichtlich wird.

Die Daten der Biotransformation bestätigen den Eindruck, dass das Verhältnis von Mediumvolumen zu Zellzahl einen großen Einfluss nicht nur auf die biochemische Leistung, sondern auch auf den Erhalt der differenzierten Zellkultur hat. Besonders gut ist dies bei der Aktivität von EROD und UGT zu sehen, die mit steigendem Mediumvolumen-Zellzahl-Verhältnis ebenfalls ansteigen. Die ECOD-Aktivität scheint sich dem entgegengesetzt zu verhalten, es muss dabei aber berücksichtigt werden, dass ein Anstieg des Volumens mit einer größeren Schlauchperipherie einhergeht, so dass Adsorptionen im unterschiedlichen Umfang auftreten. Bei den Aktivitäten der Sulfotransferase ST sind die Standardabweichungen sehr groß, so dass keine gesicherten Aussagen getroffen werden können.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zur Beurteilung einer Hepatozytenkultur nicht nur Syntheseraten oder Aktivitäten betrachtet werden dürfen, sondern dass das Umfeld der Kultivierungen einen sehr großen Einfluss auf die gemessenen Syntheseraten hat. Es ist dabei schwierig zu differenzieren, welche Parameter konzentrationsabhängig geregelt werden und welche für eine differenzierte Kultivierung essentiell sind.

Strömungsgeschwindigkeit:

Jede Hepatozyte in der intakten Leber funktioniert unter Strömungsbedingungen und nahem Blutkontakt (Flendrig et al 1997a). Direkte Strömung über den Zellen kommt *in vivo* allerdings nicht vor, da der Dissesche Spaltraum und die Gefäßwand der Sinusoide die Hepatozyten vor der Strömung in den Sinusoiden schützen. Vielmehr können sekundäre Effekte der Strömung wie eine Verbesserung der Oxygenierung und der Durchmischung im Reaktor einen positiven Einfluss auf den Zustand der Zellen ausüben (Nyberg et al 1992b). In Kap. 4 (Charakterisierung der Kultivierungssysteme) wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit zu einer Verringerung der Mischzeit und einer geringfügigen Veränderung im Verweilzeitverhalten und der Oxygenierung führt.

Unter physiologischen Bedingungen wird 1 g Leber mit $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ Blut versorgt (Brauer 1963). Nimmt man eine Zelldichte von 10^8 g^{-1} in der Leber an (Morsiani et al 1998), so ergibt sich ein Fluss von $15 \mu\text{L min}^{-1} 10^{-6}$. In vielen bioartifiziellen Lebern wird mit ähnlichen Flüssen gearbeitet, wie zum Beispiel bei Morsiani et al (2000) mit $40 \mu\text{L min}^{-1} 10^{-6}$ und bei Flendrig et al (1997a) mit $22 - 66 \mu\text{L min}^{-1} 10^{-6}$. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluss zwischen $7,5$, 15 und 60 mL h^{-1} variiert, das entspricht $2,5$, 5 und $20 \mu\text{L min}^{-1} 10^{-6}$. Für eine Beurteilung der Strömungsverhältnisse muss die lineare Strömungsgeschwindigkeit betrachtet werden, die die Bauform des Reaktors berücksichtigt. Es ist bei vielen Bioreaktoren

schwierig, eine lineare Strömungsgeschwindigkeit zu bestimmen, da die Systeme häufig nicht gleichmäßig durchströmt werden (Gerlach 1994c, Naruse et al 1998). Soweit berechenbar, ergeben sich sehr unterschiedliche Werte in der Literatur: 31,6 bzw. 75 cm min⁻¹ bei Morsiani et al (2000), 3,9 - 11,8 cm min⁻¹ bei Flendrig et al (1997a) und 0,3, 0,6 und 2,4 cm min⁻¹ in der vorliegenden Arbeit. Morsiani et al kultivierten die Leberzellen somit bei einer sehr viel höheren Strömungsgeschwindigkeit, die Zellen werden aber nur für 7 h in Kultur gehalten und sind immobilisiert und daher gegen Scherstress besser geschützt. Flendrig et al (1997a) untersuchten den Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit zwischen 3,9 – 11,8 cm min⁻¹ über einen Zeitraum von 4 Tagen und fanden keine Anzeichen für Scherstress, wie eine Abnahme der hepatischen Funktion oder eine Zunahme der Enzymfreisetzung (LDH, GOT, GPT). Den Ergebnissen von Flendrig et al zufolge ist kein negativer Einfluss durch die Strömungsgeschwindigkeiten in dem hier untersuchten Bereich zu erwarten.

Bei dem Glukoseverbrauch und der Laktatbildung ist nur eine geringe Beeinflussung durch die Strömungsgeschwindigkeit zu erkennen. Betrachtet man jedoch den stöchiometrischen Koeffizienten aus Laktatbildung und Glukoseverbrauch, so erkennt man ein Minimum von 0,06 – 0,22 für 15 mL h⁻¹ und ein Maximum von 0,1 – 0,35 bei 60 mL h⁻¹. Eine Strömungsgeschwindigkeit von 7,5 mL h⁻¹ führt zu einem Koeffizienten von 0,11 – 0,25. Eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit führt bei 15 mL h⁻¹ zu einer um etwa 25 % erhöhten Harnstoffsynthese, während 60 mL h⁻¹ die Syntheserate bereits auf die Hälfte absinken lässt. Ähnlich verhält sich die Albuminsekretion, die bei 15 mL h⁻¹ um 10 – 20 % erhöht und bei 60 mL h⁻¹ etwa um 50 % erniedrigt ist. Die LDH-Aktivität im Mediumüberstand variiert kaum, steigt aber tendenziell mit Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit. Es kann kein strömungsbedingter Einfluss auf den Zellaustrag festgestellt werden, obwohl während der Kultivierung keinerlei Maßnahmen vorgenommen wurden, die Zellen zurückzuhalten. Eine Auswertung der Daten des Primärmetabolismus lässt demnach auf einen positiven Einfluss einer Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit von 7,5 auf 15 mL h⁻¹ schließen, während eine weitere Steigerung auf 60 mL h⁻¹ eher negative Auswirkungen hat.

Bei den Aktivitäten von ECOD und EROD sind keine Unterschiede zu erkennen, die auf einen Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit schließen lassen. Die Phase II-Enzyme UGT und ST sind wegen der hohen Standardabweichungen schlecht auszuwerten. Sicher ist, dass bei allen Strömungsgeschwindigkeiten Phase II-Aktivitäten vorhanden sind, die einem leichten Aufwärtstrend folgen. Im Vergleich zum Primärmetabolismus ist dieses Verhalten etwas überraschend, aber es müssen die hohen Standardabweichungen bei den Daten der Biotransformation berücksichtigt werden, die geringfügige Unterschiede gar nicht sichtbar

machen. Der prinzipielle Trend bestätigt jedoch die Ergebnisse von Flendrig et al (1997a), die keine negativen Folgen durch die Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit im untersuchten Bereich erwarten ließen.

Sollten äußere Umstände einen Einsatz höherer Mediumflüsse erforderlich machen, so sollte allerdings der Durchmesser des Bioreaktors vergrößert werden, um die lineare Strömungsgeschwindigkeit in einem Bereich von etwa $0,6 \text{ cm min}^{-1}$ konstant zu halten.

Zelldichte:

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Untersuchung des Einflusses der Zelldichte auf den Erhalt der Vitalität und der leberspezifischen Funktionen. Für viele Anwendungen zur Produktion oder als bioartifizielle Leber sind Kultivierungen mit hohen Zelldichten vorteilhaft oder sogar erforderlich, um eine angemessene Produktkonzentration oder Wirkung zu erzielen.

Zell-Zell-Kontakte sind für den Erhalt der Differenzierung von Hepatozyten unbedingt erforderlich (Sajiki et al 2000), es konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten-Aggregate ihre Vitalität und leberspezifischen Funktionen im größeren Umfang und für eine längere Zeit bewahren als in Monolayer-Kulturen (Landry et al 1985, Tong et al 1994).

Typische Zelldichten, die in Leberzell-Kultivierungssystemen eingesetzt werden, sind $2 - 3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ (Sakai et al 1999, Hay et al 2001, Flendrig et al 1997a, Rozga et al 1993, Takeshita et al 1995), in einigen Systemen werden bis zu $5,6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ kultiviert (Naruse et al 1998, Flendrig et al 1999, Custer und Mullon 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden Kultivierungen mit den Zelldichten 2, 4 und $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ auf ihre biochemische Stabilität überprüft. Dabei wurde das Verhältnis von Mediumvolumen zu Zellzahl konstant gehalten, um den Einfluss anderer Faktoren zu minimieren.

Die Untersuchungen zum Primärmetabolismus zeigen, dass eine Erhöhung der Zelldichte von 2 auf 4 und $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ zu einem stabileren Verlauf der Kultivierung führt. Während der Glukoseverbrauch bei einer Zelldichte von $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ während der gesamten Kultivierungsdauer ansteigt, stabilisiert sich der Verbrauch bei höheren Zelldichten in der zweiten Woche. Bei der Laktatbildung zeigen sich keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Zelldichte. Sowohl bei der Harnstoffsynthese als auch bei der Albuminsekretion ist die zellspezifische Rate in der ersten Woche bei einer Zelldichte von $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ hoch, fällt während der zweiten Woche aber auf unter 50 % des Ausgangswertes ab. Höhere Zelldichten führen auch bei diesen beiden Parametern zu sehr stabilen Syntheseraten, die aber bei einer

Zelldichte von $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ etwa um 50 % höher ist als bei $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Eine Zelldichte von $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ führt während der zweiten Woche bei der Harnstoffsynthese zu den höchsten gemessenen Werten und bei der Albuminsekretion während der gesamten Kultivierungsdauer. Allerdings sind sowohl die LDH-Aktivität als auch der Zellaustrag bei höheren Zelldichten während der ersten beiden Tage in Kultur gegenüber einer Zelldichte von $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ leicht erhöht.

Wie schon bei den Untersuchungen zum Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit festgestellt wurde, liefern die Daten der Biotransformation auch hier kein eindeutiges Ergebnis. Prinzipiell kann unter allen Kultivierungsbedingungen sowohl Phase I- als auch Phase II-Aktivität festgestellt werden. Die Daten des Primärmetabolismus deuten darauf hin, dass eine Erhöhung der Zelldichte auf $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ zu einer Stabilisierung der Kultur bei gleichzeitiger Verbesserung der biochemischen Parameter führt. Auch die Leistungen der Biotransformation scheinen sich nicht wesentlich mit der Erhöhung der Zelldichte zu verschlechtern. Somit können in dem Oxy-HFB bis zu $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ kultiviert werden, das Optimum scheint aber bei einer Zelldichte von $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ zu liegen.

Fazit:

Mit den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Oxy-HFB gut geeignet ist, Prozessoptimierungen und Grundlagenuntersuchungen bei der Leberzellkultivierung durchzuführen. Zur weiteren Optimierung der Kultivierung im Oxy-HFB sollten die gewonnenen Erfahrungen zusammengeführt und folgende Bedingungen getestet werden: Mediumfluss von 15 mL h^{-1} bei einer Zelldichte von $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ und einem Mediumvolumen von mindestens $1 \text{ mL } 10^{-6}$. Diese Kombination sollte nach den bisherigen Erfahrungen zu deutlich besser erhaltenen Leberzellkulturen führen als sie in der Kontrolle, einer Sandwichkonfiguration in der Petrischale, erhalten werden.

6.2 Expansion

Obwohl derzeit nur wenige bioartifizielle Lebersysteme mit Zelllinien arbeiten, wie z. B. das System von Sussman et al (1992), das immortalisierte humane Zellen verwendet, könnte die ideale Zelllinie viele Probleme wie die mangelnde Verfügbarkeit geeigneter Zellen und immunologische Probleme lösen (Naruse et al 2001). Aber auch Zellen aus anderen Quellen,

wie z. B. fötale Zellen oder Stammzellen, würden optimalerweise einfach in den Bioreaktor gegeben und vor Ort vermehrt werden, wie es auch bei Produktionsbioreaktoren üblich ist.

Das Problem, das sich bei der Kultivierung der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 gezeigt hatte, lag allerdings nicht bei der Expansion der Zellen, sondern beim Absterben der Zellen nach Erreichen der maximalen Zelldichte. Für den Einsatz solcher Zellen müssen demnach Möglichkeiten geschaffen werden, die Proliferation der Zellen zu einem gewünschten Zeitpunkt zu stoppen. Bei HepG2-Zellen könnte man dazu beispielsweise den Anteil des Serums im Medium verringern, bei anderen Zelllinien, besonders bei künstlich generierten, kann bereits zwischen Proliferation und Differenzierung gewechselt werden (Kobayashi et al 2000).

Chresand et al (1988) haben für die Kultivierung von Säugerzellen in einem Hohlfaserreaktor die optimale Zelldichte berechnet. Das System unterscheidet sich in einigen Punkten vom Oxy-HFB: Die Zellen wurden in einer Gelmatrix im extrakapillaren Raum immobilisiert und über die Hohlfasern mit Mediumbestandteilen versorgt. Interessanterweise wird für geometrisch ähnliche Verhältnisse wie im Oxy-HFB eine optimale Zelldichte von $1,1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ berechnet, also fast die gleiche Zelldichte, die bei der Kultivierung von HepG2 im Oxy-HFB mit $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ erreicht wurde. Die Berechnung von Chresand et al ergab außerdem eine maximale Länge des Reaktors von 5 – 7,6 cm, da sonst wegen der fehlenden internen Oxygenierung Sauerstofflimitierungen zu erwarten sind. Der Oxy-HFB hat eine Innenlänge von 5,8 cm, die wegen der internen Oxygenierung bei einem Scale-Up noch deutlich erhöht werden könnte.

Während also eine sehr hohe Zelldichte bei der Kultivierung von HepG2 erreicht werden konnte, scheint die Generationszeit relativ lang zu sein. Die Auswertung der Primärdaten lässt Rückschlüsse darauf zu, dass das Wachstum der Zellen etwa am 40. Tag in Kultur ein Ende fand. Am 56. Tag wurde die Zellzahl zu etwa $2,5 \times 10^8$ bestimmt, bei einem Inokulum von $1,8 \times 10^6$ entspricht dieses also einer Generationszahl von 7,1. Die Generationszeit wird für HepG2 mit 20 – 28 h angegeben (Knasmüller et al 1998). Das bedeutet, dass unter optimalen Bedingungen die im Oxy-HFB ermittelte Zellzahl bei demselben Inokulum innerhalb einer Woche erreicht worden wäre.

Berücksichtigt man allerdings, dass das Wachstum von HepG2-Zellen durch Zell-Zell-Kontakte inhibiert wird (Mitteregger et al 1999), so sind optimale Bedingungen nur schwer zu erreichen. Für die Kultivierung von HepG2 auf Cytodex-3-Microcarriern wird von einer Verdreifachung der Zellzahl in fünf Tagen berichtet (Mitteregger et al 1999). Khalil et al (2001) erhielten bei der Kultivierung von HepG2 auf Alginatkörnern ungefähr fünf

Zellverdopplungen (Faktor 31) in 14 Tagen, wobei nur die Wachstumsphase der Zellen berücksichtigt wurde. In beiden Fällen wurde also in etwa eine Generationszeit von drei Tagen erreicht, die immer noch deutlich niedriger ist als die in dieser Arbeit abgeschätzte Generationszeit von fünf bis sechs Tagen.

Die Erklärung für die Diskrepanz ist naheliegend: Im Oxy-HFB wurde die Gesamtzeit zwischen Aufgabe der Zellen und einem nur schwer ermittelbaren Zeitpunkt für das Ende des Wachstums ermittelt, die vermutlich viel größer ist als die eigentliche Wachstumsphase. Weiterhin liegen die Zellen im Oxy-HFB nicht vereinzelt vor, sondern bilden schon von vornherein Aggregate, so dass Limitierungen durch die Zell-Zell-Kontakte von Anfang an gegeben sind. Die Daten des Primärmetabolismus deuten zwar daraufhin, dass die Zellzahl bis zum 40. Tag zunimmt, dafür wurde aber angenommen, dass die spezifischen Produktions- und Verbrauchsraten konstant bleiben. Zumindest für die Albuminproduktion ist bekannt, dass sie ansteigt, wenn vermehrt Zell-Zell-Kontakte vorhanden sind (Mitteregger et al 1999). Ebenso können Glukoseverbrauch und Laktatbildung zunehmen, wenn beispielsweise die Sauerstoffversorgung schlechter wird. Dafür spricht das stöchiometrische Verhältnis von Laktatbildung zu Glukoseverbrauch, das am 20. Tag ca. 1 ist und dann bis auf 1,8 am 50. Tag zunimmt.

Der Oxy-HFB zeigt sich somit zur Expansion und Kultivierung von Zelllinien als sehr gut geeignet. Eine weitere Optimierung der Besiedelung könnte zu kleineren Zellaggregaten führen, so dass die Expansion beschleunigt werden würde.

6.3 Vergleich des Oxy-HFB mit verschiedenen Bioreaktorsystemen

Für die Kultivierung von Leberzellen wurde in dieser Arbeit ein oxygenierender Hohlfaserreaktor entwickelt, der den hohen Anforderungen zur Erhaltung primärer hepatischer Zellen entspricht. Es wurde ein Hohlfaserreaktor ausgewählt, um ein kleines Verhältnis von extrakapillarem Volumen für Medium zur oxygenierenden Fläche der Membranen zu erhalten. In der intakten Leber funktioniert jede Hepatozyte unter Strömungsbedingungen und Blutkontakt. Der Bioreaktor imitiert diese geometrischen Bedingungen, die für einen optimalen Substrat- und Metabolitaustausch zwischen Hepatozyten und Medium essentiell sind. Die Hohlfasern haben einen konstanten Abstand von 200 μm , der gewählt wurde, um homogene und kleine Zellaggregate zu erhalten, die den Massentransfer unterstützen sollen. Die kurzen Entfernungen im Oxy-HFB minimieren

Probleme der Oxygenierung und beim Quadrox zusätzlich auch der Temperierung. Weitergehende Reduzierungen des Abstands zwischen den Hohlfasern erscheinen nicht als sinnvoll, da die Größe der Zellen *per se* (20 – 25 µm) und andere physikalische Effekte, wie Grenzschichteffekte und Reibungskräfte dem entgegenstehen.

Die integrierte Oxygenierung durch die Hohlfasermembran ermöglicht eine direkte Oxygenierung der Hepatozyten vor Ort und führt somit zu niedrigen Diffusionsgradienten wie in der intakten Leber, die unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit oder der Anwesenheit von O₂-tragenden Erythrozyten ist. Dadurch wird eine optimale Oxygenierung der Zellen durch Perfusion der Hohlfasern mit physiologischen Sauerstoffkonzentrationen ermöglicht. Im Gegensatz dazu müssen externe Oxygenatoren in der Regel mit höheren Sauerstoffkonzentrationen betrieben werden, die am Bioreaktoreingang für die Zellen toxisch sind, aber notwendig, um Sauerstoffmangel am Bioreaktorausgang zu vermeiden.

Die metabolischen Bedürfnisse von Hepatozyten, insbesondere die hohen Sauerstoffverbrauchsrate, stellen strenge Anforderungen an ein Bioreaktorsystem. Werden diese Aspekte nicht genügend berücksichtigt, so decken die Zellen ihren Energiebedarf mittels anaerober Glykolyse, und stark O₂-abhängige Vorgänge wie der Phase I-Metabolismus können nicht mehr funktionieren. Jensen et al (1976) haben berechnet, dass bereits eine Mediumschichtdicke von 1 mm zu erheblichen Sauerstofflimitierungen führt. Hay et al (2000) haben in einem mathematischen Modell für eine bioartifizielle Leber festgestellt, dass der Sauerstoffbedarf der Zellen in ihrem System nicht vollständig gedeckt werden konnte. Das System besteht aus einer mit Blut perfundierten Hohlfaserkartusche, in der die Zellen im extrakapillaren Raum angesiedelt sind. Die Begasung erfolgt intern über die Hohlfasern. Hay et al zeigten weiterhin, dass die Abnahme des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs in erster Linie über die Hohlfaserlänge auftrat, die mit 32 cm deutlich größer ist als in dem hier vorgestellten System.

Deshalb wurden in dem Oxy-HFB spezielle Hohlfasern benutzt, die für die Oxygenierung im medizinischen Einsatz optimiert sind. Die integrierte Oxygenierung bietet wegen ihrer Dezentralität auch die Möglichkeit zur nahezu beliebigen Skalierung – zum Einsatz im pharmakologischen Screening, zur Grundlagenforschung im mL-Maßstab, zur Produktion von Wirkstoffen oder dem Einsatz als bioartifizielle Leber im L-Maßstab. Die gleichmäßig angeordneten Hohlfasermatten mit einem konstanten Abstand von 200 µm führen zu einem streng geometrischen Aufbau, der im Vergleich zu unsymmetrischen Systemen gleichmäßigere Bedingungen und eine mathematische Modellierung erlaubt. Zur Zeit ist der streng geometrische Aufbau allerdings nur im Quadrox gegeben, da der Oxy-HFB in

Handarbeit hergestellt wurde und somit kleine Unregelmäßigkeiten im Aufbau unvermeidlich sind. Dieses würde sich bessern, wenn der Oxy-HFB maschinell hergestellt werden würde.

Unabhängig von der Art des Bioreaktors und den Theorien, die dahinter stehen, interessiert den Anwender die Leistungsfähigkeit des Systems. Tab. 6–1 gibt einen kurzen Überblick über die verschiedenen Bioreaktorsysteme. In Kap. 6.1.1 wurden die biochemischen Daten des Primärmetabolismus und der Biotransformation von Kultivierungen im Oxy-HFB mit Daten aus der Literatur von Kultivierungen in der Sandwichkonfiguration und im Bioreaktor verglichen: Während der Primärmetabolismus im Oxy-HFB gut erhalten ist, dem in der Sandwichkonfiguration entspricht und anderen Bioreaktorsystemen überlegen ist, sind deutliche Unterschiede in der Biotransformation festzustellen. Zur Leistungsfähigkeit der Biotransformation liegen leider nur Vergleichsdaten vom Flachmembranreaktor vor, in dem die Zellen in der Sandwichkonfiguration kultiviert werden. Die Phase I-Aktivitäten sind im Flachmembranreaktor deutlich höher als im Oxy-HFB (Faktor 4 – 15), während der Unterschied bei den Phase II-Aktivitäten geringer ist (maximal Faktor 2). Hierfür sind zwei Ursachen zu nennen: Die Leberzellen im Flachmembranreaktor werden in einem Monolayer direkt auf der mit Collagen-beschichteten oxygenierenden Membran kultiviert, womit sichergestellt ist, dass jede Zelle eine optimale Sauerstoffversorgung erfährt und der sauerstoffabhängige Phase I-Metabolismus nicht limitiert wird. Der zweite Grund ist die unterschiedliche Wasserlöslichkeit von Phase I- und Phase II-Metaboliten zu sehen, da Phase I-Metabolite besser an die Hohlfasern adsorbieren und daher für die Messung fehlen.

Der große Vorteil des Oxy-HFB ist das sehr gute Oberflächen-Volumen-Verhältnis von über $60 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$. Dadurch können Bedingungen wie im Organ hergestellt werden. Durch hohe Zelldichten werden Zell-Zell-Kontakte ermöglicht, ohne dass gleichzeitig Substratlimitierungen oder Produkthemmungen auftreten. Im Oxy-HFB wurden Zellen in einer Dichte von $2, 4$ und $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ kultiviert, wobei erst eine Zelldichte von $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ zu einer geringfügigen Verschlechterung der Zellkultur führt.

Gerlach et al (1995) haben $2,5 \times 10^9$ porcine Hepatozyten in einen Bioreaktor mit einem Gesamtvolumen von 790 mL (inklusive Schläuche) gegeben. Takeshita et al (1995) kultivierten Rattenhepatozyten in einem dreidimensionalen Modul mit Collagengel in einer Zelldichte von $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Die biochemische Leistung war über einen Zeitraum von 12 Tagen gut, nahm aber im weiteren Verlauf der Kultivierung ab. Hohe Zelldichten werden von Flendrig et al (1999, $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) erreicht, der eine Anwendung entwickelte, die einen integrierten Oxygenator und eine Polyester-Matrix zur Immobilisierung der Zellen enthält. In einer Scale-Up-Version können bis zu 2×10^{10} porcine Hepatozyten kultiviert werden.

Tab. 6-1: Vergleich verschiedener Bioreaktorsysteme für die Kultivierung von primären Hepatozyten.

	Oxy-HFB	De Bartolo et al 2000, Langsch und Bader 2001	Flendrig et al 1999	Gerlach et al 1994a, 1995	Naruse et al 1996b, 1998	Takeshita et al 1995
Zellort	Extrakapillarer Raum	Sandwichkonfiguration	Extrakapillarer Raum	Extrakapillarer Raum	Polyester-Matrix	Extrakapillarer Raum
Funktion der Hohlfasern	Oxygenierung	Keine Hohlfasern	Oxygenierung	1. Oxygenierung 2. Medium einlass 3. Medium auslass 4. Co-Kultivierung	Keine Hohlfasern	Medium
Zusätzliche Komponenten	Keine	Zwei Collagenschichten	Polyester-Matrix	Beschichtung der Hohlfasern mit Biomatrix	Polyester-Matrix, Collagen- Beschichtung	Extrakapillarer Raum: Collagengel
Oxygenierung	Intern	intern	intern	intern	Extern	extern
Zellart	Primäre porcine Hepatozyten	Primäre porcine Hepatozyten	Primäre porcine Hepatozyten	Primäre porcine Hepatozyten	Primäre porcine Hepatozyten	Primäre Rattenhepatozyten
Zelldichte	$2 - 6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$	$1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$	$2 - 4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$	$3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1} (?)$	$5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$	$2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$
Kultivierungs- dauer	2 Wochen	3 Wochen	4 Tage	2 - 3 Wochen (max. 7 Wochen)	4 - 6 Tage	12 Tage

Naruse et al (1998) entwickelten ein Bioreaktormodul, in dem Hepatozyten in einer Polyestermatrix kultiviert werden und erhielten eine maximale Zelldichte von $6,5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Versuche wurden allerdings nur mit $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ durchgeführt, die über 4 – 6 Tage eine biochemische Stabilität zeigen (Naruse et al 1996b). Der Flachmembranreaktor (De Bartolo et al 2000) führt aufgrund seiner Sandwichkonfiguration lediglich zu einer Zelldichte von $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, die während der Kultivierung auf bis zu $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ gesteigert werden kann.

Fazit:

Der Oxy-HFB zeigt gute biochemische Leistungen im Vergleich zu etablierten Systemen. Lediglich der Flachmembranreaktor von Bader et al weist im Bereich der Biotransformation zum Teil deutlich bessere Aktivitäten auf und scheint somit, wie bereits erwartet, für pharmakologische Untersuchungen besser geeignet zu sein. Für viele Anwendungen im Bereich der Leberzellkultivierung sind aber höhere Zellzahlen erforderlich und teilweise auch die Verwendung von Matrixbestandteilen unerwünscht, so dass das dreidimensionale Prinzip des Oxy-HFB hier besser geeignet ist.

Das in dieser Arbeit eingeführte Konzept zur Kultivierung von Leberzellen basiert auf einem extrem einfachen System, das nur eine Trägerstruktur enthält, die gleichzeitig zur Oxygenierung der Zellen genutzt wird und homogene Verhältnisse im Bioreaktor ermöglicht. Damit konnte die allgemeine Annahme, dass die Kultivierung von differenzierten Leberzellen nur mit erheblichem Aufwand und komplizierten Systemen erfolgreich sein kann, widerlegt werden.

7 Ausblick

Der Oxy-HFB hat seine Eignung als Kultivierungssystem für primäre Leberzellen und zur Expansion von Leberzelllinien gezeigt. Ein direkter Einsatz des Kultivierungssystems ist allerdings in den meisten Fällen nicht möglich.

Für den Einsatz des Oxy-HFB im pharmakologischen Screening ist der Bioreaktor in vielen Fällen zu groß, da nur wenig Probenmaterial für die Analyse notwendig ist und somit unnötig Material verbraucht werden würde. Die Verkleinerung des Bioreaktors kann über eine Verringerung der Länge erreicht werden, so dass wahrscheinlich auf das zusätzliche Begasen verzichtet werden kann, da die Diffusionswege in den Oxygenierungsfasern klein werden. Als Problem stellt sich in der pharmakologischen Forschung allerdings das große Adsorptionspotential der Hohlfasern dar. Hier scheint eine Vorsättigung der Hohlfasern erfolgsversprechend zu sein, so dass der eigentliche Wirkstoff und dessen Metabolite im Medium verbleiben. Ein großer Vorteil des Oxy-HFB für die pharmakologische Forschung ist die große Flexibilität des Systems, durch die die Versuche sowohl im kontinuierlichen als auch im batchweisen Ansatz durchgeführt werden könnten. Dabei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass hohe Zellzahlen in der Batch-Kultur einen häufigen Mediumwechsel erforderlich machen, da ansonsten ein frühzeitiges Entdifferenzieren oder das Absterben der Zellen zu erwarten ist.

Für die Anwendung im medizinischen Bereich als bioartifizielle Leber und auch für die meisten Produktionseinsätze ist der Oxy-HFB in seiner jetzigen Größe mit 2,5 mL Mediumvolumen zu klein. Aufgrund seiner einfachen und symmetrischen Konstruktion und der internen Oxygenierung sollte eine Maßstabsvergrößerung problemlos durchzuführen sein. Allerdings sollte ein direktes Scale-Up vermieden werden, da die erforderlichen Mediumflüsse zu hohen linearen Strömungsgeschwindigkeiten führen könnten. Eine überproportionale Erhöhung des Durchmessers würde nicht nur zu geringeren Strömungsgeschwindigkeiten führen, sondern auch die Sauerstoffabnahme über die Länge der Hohlfasern reduzieren. Es sollte somit kein Problem sein, Bioreaktoren zu konstruieren die z. B. bei einem Innendurchmesser von 9 cm und einer Innenlänge von 29 cm zu einem Mediumvolumen von 1,25 L führen und somit die Kultivierung von 5×10^{10} Zellen bei einer Zelldichte von $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ermöglichen.

Als Alternative zum Oxy-HFB könnte ebenfalls versucht werden, den Quadrox zur Kultivierung von Leberzellen im großen Maßstab einzusetzen. Das Design des Quadrox ermöglicht durch die Würfelform und der Anordnung der Hohlfasermatten bis zu vier

verschiedene Kompartimente, die z. B. für eine simultane Dialyse während der Kultivierung eingesetzt werden könnten. Problematisch ist allerdings die Bildung von Toträumen im Quadrox, da der ursprüngliche Zweck als Oxygenator weitaus höhere Strömungsgeschwindigkeiten erfordert. Wahrscheinlich ist es nur mit großem Aufwand möglich, diese Toträume durch Änderungen in der Konstruktion auch bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten, wie sie in der Zellkultur eingesetzt werden, zu vermeiden.

Die Entwicklung eines Bioreaktors für die Anwendung als bioartifizielle Leber muss einhergehen mit der verbesserten Verfügbarkeit humaner Hepatozyten. Der Einsatz porciner Leberzellen erlaubt die Entwicklung solcher Systeme, bis adäquate Zellen in ausreichender Zahl vorhanden sind. Die Möglichkeit, eine große Anzahl von differenzierten Leberzellen zu isolieren, kann die Unfähigkeit der Leberzellkultursysteme kompensieren, adulte Hepatozyten zu vermehren. Daher wurden im Oxy-HFB porcine Leberzellen kultiviert. Aufgrund immunologischer und virologischer Probleme sollte das System aber, sobald möglich, mit primären humanen Hepatozyten getestet werden.

Eine weitergehende Optimierung der Kultivierungsbedingungen lässt einen noch besseren Erhalt der leberspezifischen Funktionen über einen längeren Zeitraum erwarten, die Grenzen hierfür konnten in dieser Arbeit nicht mehr aufgezeigt werden. Es sollte auch problemlos möglich sein, das hier entwickelte Zellkultivierungssystem auf andere adhärente Zellen wie z. B. Endothelien (Gefäßzellen), Fibroblasten (Gefäßzellen), Neuronen (Nervenzellen), Chondrozyten (Knorpelzellen) oder Cardiomyocyten (Herzmuskelzellen) zu übertragen, um beispielsweise umfassende pharmakologische Untersuchungen vornehmen zu können.

Die Vielfalt der beschriebenen weiterführenden Möglichkeiten und Ideen zeigt, dass im Rahmen dieser Arbeit eine breite Grundlage für weitere Forschung geschaffen worden ist, die schließlich zur Anwendung in verschiedenen Bereichen führen kann.

8 Zusammenfassung

Die Kultivierung differenzierter hepatischer Zellen gilt allgemein als schwierig, ist aber vielseitig für pharmakologische Zwecke, als bioartifizielle Leber oder zur Produktion von Gerinnungsfaktoren oder Serumproteinen einsetzbar.

Darum wurde in dieser Arbeit ein Kultivierungssystem entwickelt, das den hohen Anforderungen der Erhaltung und Expansion von Leberzellen entspricht. Der dabei entwickelte oxygenierende Hohlfaserbioreaktor (Oxy-HFB) bietet eine vom Mediumfluss unabhängige Versorgung mit Sauerstoff über die Trägerstruktur und vermeidet durch einen homogenen Aufbau bei Abständen von etwa 200 µm zwischen den Hohlfasern lange Diffusionsstrecken. Die Zellen werden im extrakapillaren Raum kultiviert und kommen in direkten Kontakt mit dem Medium.

Zur generellen Überprüfung des sehr einfachen Prinzips zur Kultivierung von Leberzellen wurde zuerst ein kommerziell erhältlicher Oxygenator (Quadrox) eingesetzt, der den aufgeführten Kriterien nahe kam. Über einen Zeitraum von drei Wochen wurden erfolgreich differenzierte primäre porcine Leberzellen in Kultur gehalten. Die Charakterisierung des Systems hinsichtlich des Verweilzeitverhaltens, der Mischzeit und der Sauerstoffversorgung ergab allerdings Nachteile des Systems, insbesondere durch die Bildung von Toträumen, so dass der Oxy-HFB entwickelt und ebenfalls charakterisiert wurde.

Zum Nachweis der Eignung des Oxy-HFB wurden primäre porcine Leberzellen unter Variation des zur Verfügung stehenden Mediumvolumens (2,5, 12,5 und 50 mL), der Zelldichte ($2, 4$ und $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) und des Mediumflusses ($7,5, 15$ und 60 mL h^{-1}) kultiviert. Dabei zeigten die Zellkulturen nicht nur ein stabiles Verhalten des Primärmetabolismus, sondern auch der Biotransformationsleistung über den untersuchten Zeitraum von zwei Wochen. Die besten Resultate wurden mit einer Zelldichte von $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, einem Mediumfluss von 15 mL h^{-1} und einem Mediumvolumen von mindestens $1 \text{ mL } 10^{-6}$ für 48 h gefunden.

Die Experimente zeigten, dass der Oxy-HFB zur Zeit für viele Anwendungen im Bereich der Leberzellkultivierung besser geeignet ist als andere veröffentlichte Kultivierungssysteme: Der Oxy-HFB erlaubt eine Vielzahl von Variationen im Versuchsaufbau und ist daher für die Untersuchung von zellulären oder pharmakologischen Mechanismen gut geeignet. Ein maßstabsvergrößerter Bioreaktor würde eine Hochzelldichte-Kultivierung von differenzierten Leberzellen erlauben, die für Produktionszwecke oder den Einsatz als bioartifizielle Leber verwendet werden könnte.

9 Literaturverzeichnis

- Annoni, G.; Weiner, F. R.; Colombo, M.; Czaja, M. J.; Zern, M. A. Albumin and collagen gene regulation in alcohol- and virus-induced human liver disease. *Gastroenterology* **1990**, *98*, 197-202.
- Arnaout, W. S.; Moscioni, A. D.; Barbour, R. L.; Demetriou, A. A. Development of bioartificial liver: bilirubin conjugation in Gunn rats. *J Surg Res* **1990**, *48*, 379-82.
- Bader, A.; Rinkes, I. H.; Closs, E. I.; Ryan, C. M.; Toner, M.; Cunningham, J. M.; Tompkins, R. G.; Yarmush, M. L. A stable long-term hepatocyte culture system for studies of physiologic processes: cytokine stimulation of the acute phase response in rat and human hepatocytes. *Biotechnol Prog* **1992**, *8*, 219-25.
- Bader, A.; Knop, E.; Fruhauf, N.; Crome, O.; Boker, K.; Christians, U.; Oldhafer, K.; Ringe, B.; Pichlmayr, R.; Sewing, K. F. Reconstruction of liver tissue in vitro: geometry of characteristic flat bed, hollow fiber, and spouted bed bioreactors with reference to the in vivo liver. *Artif Organs* **1995**, *19*, 941-50.
- Bader, A.; Knop, E.; Kern, A.; Boker, K.; Fruhauf, N.; Crome, O.; Esselmann, H.; Pape, C.; Kempka, G.; Sewing, K. F. 3-D coculture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes- design of an organotypical model. *Exp Cell Res* **1996**, *226*, 223-33.
- Bader, A.; De Bartolo, L.; Haverich, A. High level benzodiazepine and ammonia clearance by flat membrane bioreactors with porcine liver cells. *J Biotechnol* **2000**, *81*, 95-105.
- Bailey, J. E.; Ollis, D. F. (1986). "Biochemical engineering fundamentals," 2nd edition/Ed. McGraw-Hill.
- Ballard, F. J.; Hanson, R. W. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver. *Biochem J* **1967**, *104*, 866-71.
- Behnia, K.; Bhatia, S.; Jastromb, N.; Balis, U.; Sullivan, S.; Yarmush, M.; Toner, M. Xenobiotic metabolism by cultured primary porcine hepatocytes. *Tissue Eng* **2000**, *6*, 467-79.
- Bhandari, R. N.; Riccalton, L. A.; Lewis, A. L.; Fry, J. R.; Hammond, A. H.; Tendler, S. J.; Shakesheff, K. M. Liver tissue engineering: a role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability. *Tissue Eng* **2001**, *7*, 345-57.
- Bissell, D. M.; Levine, G. A.; Bissell, M. J. Glucose metabolism by adult hepatocytes in primary culture and by cell lines from rat liver. *Am J Physiol* **1978**, *234*, C122-130.
- Blaauboer, B. J.; Wortelboer, H. M.; Mennes, W. C. The use of liver cell cultures derived from different mammalian species in vitro toxicological studies. *ATLA* **1990**, *18*, 251-258.
- Bouwens, L.; Wisse, E. Recent insights into hepatic "pit cells" or natural killer cells. *Reg Immunol* **1988**, *1*, 137-41.

- Bouwens, L.; De Bleser, P.; Vanderkerken, K.; Geerts, B.; Wisse, E. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* **1992**, *46*, 155-68.
- Brauer, R. W. Liver circulation and function. *Physiol Rev* **1963**, *43*, 115-213.
- Brown, S. E.; Guzelian, C. P.; Schuetz, E.; Quattrochi, L. C.; Kleinman, H. K.; Guzelian, P. S. Critical role of extracellular matrix on induction by phenobarbital of cytochrome P450 2B1/2 in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Lab Invest* **1995**, *73*, 818-27.
- Chresand, T. J.; Gillies, R. J.; Dale, B. E. Optimum fiber spacing in a hollow fiber bioreactor. *Biotech Bioeng* **1988**, *32*, 983-992.
- Cross, D. M.; Bayliss, M. K. A commentary on the use of hepatocytes in drug metabolism studies during drug discovery and development. *Drug Metab Rev* **2000**, *32*, 219-40.
- Curran, T. R., Jr.; Bahner, R. I., Jr.; Oh, W.; Gruppuso, P. A. Mitogen-independent DNA synthesis by fetal rat hepatocytes in primary culture. *Exp Cell Res* **1993**, *209*, 53-7.
- Custer, L.; Mullon, C. J. Oxygen delivery to and use by primary porcine hepatocytes in the HepatAssist 2000 system for extracorporeal treatment of patients in end-stage liver failure. *Adv Exp Med Biol* **1998**, *454*, 261-71.
- De Bartolo, L.; Jarosch-Von Schweder, G.; Haverich, A.; Bader, A. A novel full-scale flat membrane bioreactor utilizing porcine hepatocytes: cell viability and tissue-specific functions. *Biotechnol Prog* **2000**, *16*, 102-8.
- Dixit, V.; Gitnick, G. Artificial liver support: state of the art. *Scand J Gastroenterol Suppl* **1996**, *220*, 101-14.
- Donato, M. T.; Castell, J. V.; Gomez-Lechon, M. J. Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol* **1999**, *31*, 542-9.
- Dore, E.; Legallais, C. A new concept of bioartificial liver based on a fluidized bed bioreactor. *Ther Apher* **1999**, *3*, 264-7.
- Dunn, J. C.; Yarmush, M. L.; Koebe, H. G.; Tompkins, R. G. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration [published erratum appears in FASEB J 1989 May;3(7):1873]. *Faseb J* **1989**, *3*, 174-7.
- Dunn, J. C.; Tompkins, R. G.; Yarmush, M. L. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* **1991**, *7*, 237-45.
- Ehrmann, L.; Ley, G. O. The growth of cells on a gel of reconstituted rat tail collagen. *J Nat Can Inst* **1986**, *16*, 1375-1400.
- Ekins, S.; Ring, B. J.; Grace, J.; McRobie-Belle, D. J.; Wrighton, S. A. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods* **2000**, *44*, 313-24.

- Fausto, N. Liver regeneration. *J Hepatol* **2000**, 32 Suppl 1, 19-31.
- Fitzpatrick, L.; Jenkins, H. A.; Butler, M. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. *Appl Biochem Biotechnol* **1993**, 43, 93-116.
- Flendrig, L. M.; la Soe, J. W.; Jorning, G. G.; Steenbeek, A.; Karlsen, O. T.; Bovee, W. M.; Ladiges, N. C.; te Velde, A. A.; Chamuleau, R. A. In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. *J Hepatol* **1997a**, 26, 1379-92.
- Flendrig, L. M.; te Velde, A. A.; Chamuleau, R. A. Semipermeable hollow fiber membranes in hepatocyte bioreactors: a prerequisite for a successful bioartificial liver? *Artif Organs* **1997b**, 21, 1177-81.
- Flendrig, L. M.; Chamuleau, R. A.; Maas, M. A.; Daalhuisen, J.; Hasset, B.; Kilty, C. G.; Doyle, S.; Ladiges, N. C.; Jorning, G. G.; la Soe, J. W.; Sommeijer, D.; te Velde, A. A. Evaluation of a novel bioartificial liver in rats with complete liver ischemia: treatment efficacy and species-specific alpha-GST detection to monitor hepatocyte viability. *J Hepatol* **1999**, 30, 311-20.
- Forbes, S.; Vig, P.; Poulsom, R.; Thomas, H.; Alison, M. Hepatic stem cells. *J Pathol* **2002**, 197, 510-8.
- Garcia-Briones, M. A.; Brodkey, R. S.; Chalmers, J. J. Computer simulations of the rupture of gas bubble at a gas/liquid interface and its implications in animal cell damage. *Chem Eng Sci* **1994**, 49, 2301-2320.
- Gerlach, J.; Kloppel, K.; Stoll, P.; Vienken, J.; Muller, C. Gas supply across membranes in bioreactors for hepatocyte culture. *Artif Organs* **1990**, 14, 328-33.
- Gerlach, J. C.; Encke, J.; Hole, O.; Muller, C.; Courtney, J. M.; Neuhaus, P. Hepatocyte culture between three dimensionally arranged biomatrix- coated independent artificial capillary systems and sinusoidal endothelial cell co-culture compartments. *Int J Artif Organs* **1994a**, 17, 301-6.
- Gerlach, J. C.; Encke, J.; Hole, O.; Muller, C.; Ryan, C. J.; Neuhaus, P. Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion. *Transplantation* **1994b**, 58, 984-8.
- Gerlach, J. C. Use of hepatocyte cultures for liver support bioreactors. *Adv Exp Med Biol* **1994c**, 368, 165-71.
- Gerlach, J. C.; Schnoy, N.; Encke, J.; Smith, M. D.; Muller, C.; Neuhaus, P. Improved hepatocyte in vitro maintenance in a culture model with woven multicompartiment capillary systems: electron microscopy studies. *Hepatology* **1995**, 22, 546-52.
- Gerlach, J. C. Development of a hybrid liver support system: a review. *Int J Artif Organs* **1996**, 19, 645-54.

- Gibson, G. G.; Skett, P. (2001). "Introduction to drug metabolism," Nelson Thornes Publishers.
- Grant, M. H.; Hawksworth, G. M. The activity of UDP-glucuronyltransferase, sulphotransferase and glutathione-S-transferase in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **1986**, *35*, 2979-2982.
- Grant, M. H.; Anderson, K.; McKay, G.; Wills, M.; Henderson, C.; MacDonald, C. Manipulation of the phenotype of immortalised rat hepatocytes by different culture configurations and by dimethyl sulphoxide. *Hum Exp Toxicol* **2000**, *19*, 309-17.
- Hamamoto, R.; Kamihira, M.; Iijima, S. Growth and differentiation of cultured fetal hepatocytes isolated various developmental stages. *Biosci Biotechnol Biochem* **1999**, *63*, 395-401.
- Harrison, R. G. Observation on the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol Med* **1907**, *4*, 140-143.
- Haussinger, D.; Lamers, W. H.; Moorman, A. F. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* **1992**, *46*, 72-93.
- Hay, P. D.; Veitch, A. R.; Smith, M. D.; Cousins, R. B.; Gaylor, J. D. Oxygen transfer in a diffusion-limited hollow fiber bioartificial liver. *Artif Organs* **2000**, *24*, 278-88.
- Hay, P. D.; Veitch, A. R.; Gaylor, J. D. Oxygen transfer in a convection-enhanced hollow fiber bioartificial liver. *Artif Organs* **2001**, *25*, 119-30.
- Hengstler, J. G.; Utesch, D.; Steinberg, P.; Platt, K. L.; Diener, B.; Ringel, M.; Swales, N.; Fischer, T.; Biefang, K.; Gerl, M.; Bottger, T.; Oesch, F. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev* **2000**, *32*, 81-118.
- Hoogenboom, L. A.; Pastoor, F. J.; Clous, W. E.; Hesse, S. E.; Kuiper, H. A. The use of porcine hepatocytes for biotransformation studies of veterinary drugs. *Xenobiotica* **1989**, *19*, 1207-19.
- Hooper, W. D.; Watt, J. A.; McKinnon, G. E.; Reilly, P. E. Metabolism of diazepam and related benzodiazepines by human liver microsomes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **1992**, *17*, 51-9.
- Hwang, Y. J.; Kim, Y. I.; Lee, J. G.; Lee, J. W.; Kim, J. W.; Chung, J. M. Development of bioartificial liver system using a fluidized-bed bioreactor. *Transplant Proc* **2000**, *32*, 2349-2351.
- Inaba, T.; Tait, A.; Nakano, M.; Mahon, W. A.; Kalow, W. Metabolism of diazepam in vitro by human liver. Independent variability of N-demethylation and C3-hydroxylation. *Drug Metab Dispos* **1988**, *16*, 605-8.

- Jauregui, H. O.; Naik, S.; Santangini, H.; Pan, J.; Trenkler, D.; Mullon, C. Primary cultures of rat hepatocytes in hollow fiber chambers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **1994**, *30A*, 23-9.
- Jensen, M. D.; Wallach, D. F.; Sherwood, P. Diffusion in tissue cultures on gas-permeable and impermeable supports. *J Theor Biol* **1976**, *56*, 443-58.
- Joly, A.; Desjardins, J. F.; Fremond, B.; Desille, M.; Campion, J. P.; Malledant, Y.; Lebreton, Y.; Semana, G.; Edwards-Levy, F.; Levy, M. C.; Clement, B. Survival, proliferation, and functions of porcine hepatocytes encapsulated in coated alginate beads: a step toward a reliable bioartificial liver. *Transplantation* **1997**, *63*, 795-803.
- Jorjani, P.; Ozturk, S. S. Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. *Biotechnol Bioeng* **1999**, *64*, 349-56.
- Karim, N.; Allmeling, C.; Hengstler, J.-G.; Haverich, A.; Bader, A. Diazepam metabolism and albumin secretion of porcine hepatocytes in collagen-sandwich after cryopreservation. *Biotechnol Lett* **2000**, *22*, 1647-1652.
- Kelly, J. H.; Sussman, N. L. The hepatic extracorporeal liver assist device in the treatment of fulminant hepatic failure. *Asaio J* **1994**, *40*, 83-5.
- Kern, A.; Bader, A.; Pichlmayr, R.; Sewing, K. F. Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem Pharmacol* **1997**, *54*, 761-72.
- Khalil, M.; Shariat-Panahi, A.; Tootle, R.; Ryder, T.; McCloskey, P.; Roberts, E.; Hodgson, H.; Selden, C. Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *J Hepatol* **2001**, *34*, 68-77.
- Kino, Y.; Sawa, M.; Kasai, S.; Mito, M. Multiporous cellulose microcarrier for the development of a hybrid artificial liver using isolated hepatocytes. *J Surg Res* **1998**, *79*, 71-6.
- Kmiec, Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **2001**, *161*, III-XIII, 1-151.
- Knasmuller, S.; Parzefall, W.; Sanyal, R.; Ecker, S.; Schwab, C.; Uhl, M.; Mersch-Sundermann, V.; Williamson, G.; Hietsch, G.; Langer, T.; Darroudi, F.; Natarajan, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat Res* **1998**, *402*, 185-202.
- Kobayashi, N.; Fujiwara, T.; Westerman, K. A.; Inoue, Y.; Sakaguchi, M.; Noguchi, H.; Miyazaki, M.; Cai, J.; Tanaka, N.; Fox, I. J.; Leboulch, P. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes [see comments]. *Science* **2000**, *287*, 1258-62.

- Koebe, H. G.; Pahernik, S.; Eyer, P.; Schildberg, F. W. Collagen gel immobilization: a useful cell culture technique for long-term metabolic studies on human hepatocytes. *Xenobiotica* **1994**, *24*, 95-107.
- Kong, L. B.; Chen, S.; Demetriou, A. A.; Rozga, J. Matrix-induced liver cell aggregates (MILCA) for bioartificial liver use. *Int J Artif Organs* **1996**, *19*, 72-8.
- Koolman, J.; Röhm, K.-H. (1998). "Taschenatlas der Biochemie," Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Landry, J.; Bernier, D.; Ouellet, C.; Goyette, R.; Marceau, N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J Cell Biol* **1985**, *101*, 914-23.
- Langer, R.; Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **1993**, *260*, 920-6.
- Langsch, A.; Bader, A. Longterm stability of phase I and phase II enzymes of porcine liver cells in flat membrane bioreactors. *Biotechnol Bioeng* **2001**, *76*, 115-25.
- Lauber, R.; Mosimann, M.; Buhner, M.; Zbinden, A. M. Automated determination of midazolam in human plasma by high-performance liquid chromatography using column switching. *J Chromatogr B Biomed Appl* **1994**, *654*, 69-75.
- Legallais, C.; Dore, E.; Paullier, P. Design of a fluidized bed bioartificial liver. *Artif Organs* **2000**, *24*, 519-25.
- Li, A. P.; Maurel, P.; Gomez-Lechon, M. J.; Cheng, L. C.; Jurima-Romet, M. Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction. *Chem Biol Interact* **1997**, *107*, 5-16.
- Löffler, G.; Petrides, P. E. (1998). "Biochemie und Pathobiochemie," 6. Auflage/Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- McGowan, J. A.; Strain, A. J.; Bucher, N. L. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. *J Cell Physiol* **1981**, *108*, 353-363.
- Metzen, E.; Wolff, M.; Fandrey, J.; Jelkmann, W. Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures. *Respir Physiol* **1995**, *100*, 101-6.
- Mitteregger, R.; Vogt, G.; Rossmanith, E.; Falkenhagen, D. Rotary cell culture system (RCCS): a new method for cultivating hepatocytes on microcarriers. *Int J Artif Organs* **1999**, *22*, 816-22.
- Morsiani, E.; Pazzi, P.; Moscioni, A. D.; Rozga, J.; Azzena, G.; Demetriou, A. A. In vitro morphological and functional characterization of isolated porcine hepatocytes for extracorporeal liver support: bile acid uptake and conjugation. *J Surg Res* **1998**, *79*, 54-60.

- Morsiani, E.; Galavotti, D.; Puviani, A. C.; Valieri, L.; Brogli, M.; Tosatti, S.; Pazzi, P.; Azzena, G. Radial flow bioreactor outperforms hollow-fiber modules as a perfusing culture system for primary porcine hepatocytes. *Transplant Proc* **2000**, *32*, 2715-8.
- Moser, A. (1981) "Bioprozesstechnik" Springer-Verlag.
- Nagamori, S.; Hasumura, S.; Matsuura, T.; Aizaki, H.; Kawada, M. Developments in bioartificial liver research: concepts, performance, and applications [In Process Citation]. *J Gastroenterol* **2000**, *35*, 493-503.
- Naka, S.; Takeshita, K.; Yamamoto, T.; Tani, T.; Kodama, M. Bioartificial liver support system using porcine hepatocytes entrapped in a three-dimensional hollow fiber module with collagen gel: An evaluation in the swine acute liver failure model. *Artif Organs* **1999**, *23*, 822-8.
- Naruse, K.; Sakai, Y.; Nagashima, I.; Jiang, G. X.; Suzuki, M.; Muto, T. Comparisons of porcine hepatocyte spheroids and single hepatocytes in the non-woven fabric bioartificial liver module. *Int J Artif Organs* **1996a**, *19*, 605-9.
- Naruse, K.; Sakai, Y.; Nagashima, I.; Jiang, G. X.; Suzuki, M.; Muto, T. Development of a new bioartificial liver module filled with porcine hepatocytes immobilized on non-woven fabric. *Int J Artif Organs* **1996b**, *19*, 347-52.
- Naruse, K.; Nagashima, I.; Sakai, Y.; Harihara, Y.; Jiang, G. X.; Suzuki, M.; Muto, T.; Makuuchi, M. Efficacy of a bioreactor filled with porcine hepatocytes immobilized on nonwoven fabric for ex vivo direct hemoperfusion treatment of liver failure in pigs. *Artif Organs* **1998**, *22*, 1031-7.
- Naruse, K.; Sakai, Y.; Lei, G.; Sakamoto, Y.; Kobayashi, T.; Puliatti, C.; Aronica, G.; Morale, W.; Leone, F.; Qiang, S.; Ming, S. G.; Ming, S.; Li, Z.; Chang, S. J.; Suzuki, M.; Makuuchi, M. Efficacy of nonwoven fabric bioreactor immobilized with porcine hepatocytes for ex vivo xenogeneic perfusion treatment of liver failure in dogs. *Artif Organs* **2001**, *25*, 273-80.
- Neermann, J.; Wagner, R. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J Cell Physiol* **1996**, *166*, 152-69.
- Nyberg, S. L.; Platt, J. L.; Shirabe, K.; Payne, W. D.; Hu, W. S.; Cerra, F. B. Immunoprotection of xenocytes in a hollow fiber bioartificial liver. *Asaio J* **1992a**, *38*, M463-7.
- Nyberg, S. L.; Shatford, R. A.; Hu, W. S.; Payne, W. D.; Cerra, F. B. Hepatocyte culture systems for artificial liver support: implications for critical care medicine (bioartificial liver support). *Crit Care Med* **1992b**, *20*, 1157-68.
- Nyberg, S. L.; Shirabe, K.; Peshwa, M. V.; Sielaff, T. D.; Crotty, P. L.; Mann, H. J.; Remmel, R. P.; Payne, W. D.; Hu, W. S.; Cerra, F. B. Extracorporeal application of a gel-entrapment,

- bioartificial liver: demonstration of drug metabolism and other biochemical functions. *Cell Transplant* **1993**, 2, 441-52.
- Primrose, S. (1990). "Biotechnologie - Grundlagen, Anwendungen, Perspektiven," Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Reitzer, L. J.; Wice, B. M.; Kennell, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* **1979**, 254, 2669-76.
- Richman, R. A.; Claus, T. H.; Pilgis, S. J.; Friedmann, D. L. Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **1976**, 73, 3589-3593.
- Riordan, S.; Williams, R. Bioartificial liver support: developments in hepatocyte culture and bioreactor design. *Br Med Bull* **1997**, 53, 730-44.
- Rocker, D. (1999). Charakterisierung von primären Leberparenchymzellen in Sandwich-konfiguration: Langzeitkultivierung unter Erhalt der hepatischen Funktionen. PhD thesis, University of Braunschweig.
- Rothschild, M. A.; Oratz, M.; Schreiber, S. S. Serum albumin. *Hepatology* **1988**, 8, 385-401.
- Rozga, J.; Williams, F.; Ro, M. S.; Neuzil, D. F.; Giorgio, T. D.; Backfisch, G.; Moscioni, A. D.; Hakim, R.; Demetriou, A. A. Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology* **1993**, 17, 258-65.
- Sajiki, T.; Iwata, H.; Paek, H. J.; Tosha, T.; Fujita, S.; Ueda, Y.; Park, Y. G.; Zhu, B.; Satoh, S.; Ikai, I.; Yamaoka, Y.; Ikada, Y. Morphologic studies of hepatocytes entrapped in hollow fibers of a bioartificial liver. *Asaio J* **2000**, 46, 49-55.
- Sakai, Y.; Furkawa, K.; Suzuki, M. Immobilisation and long-term albumin secretion of hepatocyte spheroids rapidly formed by rotational tissue culture methods. *Biotechnol Tech* **1992**, 6, 527-32.
- Sakai, Y.; Naruse, K.; Nagashima, I.; Muto, T.; Suzuki, M. A new bioartificial liver using porcine hepatocyte spheroids in high-cell-density suspension perfusion culture: in vitro performance in synthesized culture medium and in 100% human plasma. *Cell Transplant* **1999**, 8, 531-41.
- Schmelzer, E. (2002). Optimierung der Kultur und Charakterisierung primärer embryonaler Hepatozyten der Ratte. Dissertation, TU Braunschweig.
- Schwartz, R. E.; Reyes, M.; Koodie, L.; Jiang, Y.; Blackstad, M.; Lund, T.; Lenvik, T.; Johnson, S.; Hu, W. S.; Verfaillie, C. M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* **2002**, 109, 1291-302.
- Seglen, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **1976**, 13, 29-83.

- Shatford, R. A.; Nyberg, S. L.; Meier, S. J.; White, J. G.; Payne, W. D.; Hu, W. S.; Cerra, F. B. Hepatocyte function in a hollow fiber bioreactor: a potential bioartificial liver. *J Surg Res* **1992**, *53*, 549-57.
- Shaw, M. K.; Newton, R. S.; Sliskovic, D. R.; Roth, B. D.; Ferguson, E.; Krause, B. R. Hep-G2 cells and primary rat hepatocytes differ in their response to inhibitors of HMG-CoA reductase. *Biochem Biophys Res Commun* **1990**, *170*, 726-34.
- Siewert, J. R. (1997). "Chirurgie," 6. Auflage/Ed. Springer Verlag.
- Sirica, A. E.; Pitot, H. C. Drug metabolism and effects of carcinogens in cultured hepatic cells. *Pharmacol Rev* **1979**, *31*, 205-28.
- Smith, M. D.; Smirthwaite, A. D.; Cairns, D. E.; Cousins, R. B.; Gaylor, J. D. Techniques for measurement of oxygen consumption rates of hepatocytes during attachment and post-attachment. *Int J Artif Organs* **1996**, *19*, 36-44.
- St-Pierre, M. V.; Pang, K. S. Concentration-dependent metabolism of diazepam in mouse liver. *J Pharmacokinet Biopharm* **1995**, *23*, 243-66.
- Suolinna, E. M.; Pitkaranta, T. Effect of culture age on drug metabolizing enzymes and their induction in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **1986**, *35*, 2241-5.
- Sussman, N. L.; Chong, M. G.; Koussayer, T.; He, D. E.; Shang, T. A.; Whisennand, H. H.; Kelly, J. H. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* **1992**, *16*, 60-5.
- Takeshita, K.; Ishibashi, H.; Suzuki, M.; Yamamoto, T.; Akaike, T.; Kodama, M. High cell-density culture system of hepatocytes entrapped in a three- dimensional hollow fiber module with collagen gel. *Artif Organs* **1995**, *19*, 191-3.
- te Velde, A. A.; Ladiges, N. C.; Flendrig, L. M.; Chamuleau, R. A. Functional activity of isolated pig hepatocytes attached to different extracellular matrix substrates. Implication for application of pig hepatocytes in a bioartificial liver. *J Hepatol* **1995**, *23*, 184-92.
- Theise, N. D.; Saxena, R.; Portmann, B. C.; Thung, S. N.; Yee, H.; Chiriboga, L.; Kumar, A.; Crawford, J. M. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* **1999**, *30*, 1425-33.
- Thurman, R. G.; Kauffman, F. C. Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes. *Pharmacol Rev* **1979**, *31*, 229-51.
- Tong, J. Z.; Sarrazin, S.; Cassio, D.; Gauthier, F.; Alvarez, F. Application of spheroid culture to human hepatocytes and maintenance of their differentiation. *Biol Cell* **1994**, *81*, 77-81.
- Vandenbranden, M.; Wrighton, S. A.; Ekins, S.; Gillespie, J. S.; Binkley, S. N.; Ring, B. J.; Gadberry, M. G.; Mullins, D. C.; Strom, S. C.; Jensen, C. B. Alterations of the catalytic

activities of drug-metabolizing enzymes in cultures of human liver slices. *Drug Metab Dispos* **1998**, *26*, 1063-8.

Vilei, M. T.; Granato, A.; Ferraresso, C.; Neri, D.; Carraro, P.; Gerunda, G.; Muraca, M. Comparison of pig, human and rat hepatocytes as a source of liver specific metabolic functions in culture systems--implications for use in bioartificial liver devices. *Int J Artif Organs* **2001**, *24*, 392-6.

Watanabe, N.; Tsukada, N.; Smith, C. R.; Edwards, V.; Phillips, M. J. Permeabilized hepatocyte couplets. Adenosine triphosphate-dependent bile canalicular contractions and a circumferential pericanalicular microfilament belt demonstrated. *Lab Invest* **1991**, *65*, 203-13.

Watford, M.; Chellaraj, V.; Ismat, A.; Brown, P.; Raman, P. Hepatic glutamine metabolism. *Nutrition* **2002**, *18*, 301-3.

Yanagi, K.; Ohshima, N. Improvement of metabolic performance of cultured hepatocytes by high oxygen tension in the atmosphere. *Artif Organs* **2001**, *25*, 1-6.

Yeoh, G. C.; Wassenburg, J. A.; Edkins, E.; Oliver, I. T. Synthesis and secretion of albumin and transferrin by foetal rat hepatocyte cultures. *Biochim Biophys Acta* **1979**, *565*, 347-55.

Zeng, A. P.; Deckwer, W. D. Mathematical modeling and analysis of glucose and glutamine utilization and regulation in cultures of continuous mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* **1995**, *47*, 334-346.

Zeng, A. P.; Hu, W. S.; Deckwer, W. D. Variation of stoichiometric ratios and their correlation for monitoring and control of animal cell cultures. *Biotechnol Prog* **1998**, *14*, 434-41.

Zielke, H. R.; Sumbilla, C. M.; Sevdalian, D. A.; Hawkins, R. L.; Ozand, P. T. Lactate: a major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol* **1980**, *104*, 433-41.

Zielke, H. R.; Zielke, C. L.; Ozand, P. T. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed Proc* **1984**, *43*, 121-5.

Zomorodi, K.; Carlile, D. J.; Houston, J. B. Kinetics of diazepam metabolism in rat hepatic microsomes and hepatocytes and their use in predicting in vivo hepatic clearance. *Xenobiotica* **1995**, *25*, 907-16.

10 Anhang

10.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
BR	Bioreaktor
BSA	Bovines Serum Albumin
CSTR	Continuous stirred-tank reactor
CYP	Cytochrom P450-System
DIF-Medium	HybridoMed DIF 1000
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	7-Ethoxycoumarin
ECOD	Ethoxycoumarin-O-deethylase
EGTA	Ethylene Glycol-bis(β -Aminoethyl Ether)N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
ER	7-Ethoxyresorufin
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum
Gl.	Gleichung
Glu	β -Glucuronidase
gluc.	glukuronidiert
GST	Gluthation-S-transferase
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HFM	Hohlfasermatte
HPLC	High Liquid Performance Chromatography
Kap.	Kapitel
MeOH	Methanol
min	Minute
mind.	mindestens
n	Anzahl der Meßwerte

4-MU	4-Methylumbelliferon
MUG	MU-7-Glucuronid
MUS	MU-7-Sulfat
Oxy-HFB	Oxygenierender Hohlfaserbioreaktor
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	Phosphate buffered saline
PERV	Porcines endogenes Retrovirus
PFR	Plug flow reactor
PMP	Polymethylpenten
PP	Polypropylen
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s	Sekunde
s.	siehe
spez.	spezifisch
ST	Sulfotransferase
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TPBS	Tween phosphate buffered saline
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität ($1\text{ U} = 1\text{ }\mu\text{mol min}^{-1}$)
UGT	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase
VE	Volumeneinheit
WE-Medium	William's Medium E

10.2 Symbole

Symbol	Einheit	Bedeutung
$c(t)$	g L^{-1}	Konzentration
$E(t)$	min^{-1}	Verteilungsdichtefunktion, Impulsantwort
$E(\Theta)$	1	dimensionslose Verteilungsdichtefunktion
$F(t)$	min^{-1}	Verweilzeitsummenfunktion, Sprungantwort
$F(\Theta)$	1	dimensionslose Verweilzeitsummenfunktion
F_R	mL min^{-1}	Volumenstrom im Bioreaktor
g	m s^{-2}	Erdbeschleunigung
$H(t)$	1, %	Homogenitätsgrad
H_{O_2}	N m kg^{-1}	Henrykonstante für Sauerstoff
$k_L a$	h^{-1}	volumetrischer Stoffübergangskoeffizient
OCR	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Sauerstoffverbrauchsrate, oxygen consumption rate
OTR	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Sauerstofftransportrate, oxygen transfer rate
p_{O_2}	1, %	relativer Sauerstoffpartialdruck
p_{O_2}	N m^{-2}	Sauerstoffpartialdruck
t	s, min, h	Zeit
$U(t)$	min^{-1}	Sprungfunktion
V_L	m^3	Volumen der Flüssigkeit
V_R	mL	Volumen des Bioreaktors
$\delta(t)$	min^{-1}	Impulsfunktion, Dirac-Stoß
Θ	1	aktuelle Zeit bezogen auf mittlere Verweilzeit
σ	min	Standardabweichung
σ^2	min^2	Varianz
σ_{Θ}^2	1	auf Θ bezogene Varianz
τ	min	mittlere Verweilzeit

10.3 Material

Geräte:

Autoklav 3870 ELV	Systec (Wettenberg)
Durchlichtmikroskop	Zeiss (Jena)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
ELISA-Reader MRX II	Dynex (Chantilly, Va, USA)
Eppendor fzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
Exikator	Glasbläserei der MHH
Fireboy eco	Integra Biosciences (Fernwald)
Flowmeter (65 mm, 7 mL min ⁻¹)	Cole-Parmer Instrument (London, England)
Flowmeter (150 mm, 15 mL min ⁻¹)	Cole-Parmer Instrument (London, England)
HPLC-Anlage LaChrom	Merck Hitachi (Göttingen)
Interface D-7000, Diode Array Detector L-7450,	
Autosampler L-7200, Pumpe L-7100	
Inkubator, Cytoperm 2	Heraeus (Hannover-Hamburg)
Kamera Canon AE-1	Canon (Japan)
Kühlzentrifuge Omnifuge 2.0 RS	Heraeus (Hannover-Hamburg)
Laborrührer mit Heizung	Omnilab (Bremen)
Low Profile Roller	Stovall (Greensboro, NC, USA)
Microprocessor pH-Meter pH 539	WTW (Weilheim)
Microtiter Plate Fluorometer, Fluorolite 1000	Dynatech Laboratories (Denkendorf)
Multikanalpipette	Eppendorf (Hamburg)
Multipette	Eppendorf (Hamburg)
Pipettboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Pipettierhilfen	Eppendorf (Hamburg)
Photometer Milton Roy Spectronic 1201	Jürgens (Hannover)
Pumpe, IPC-24, ISM 769	Ismatec (Wertheim-Mondfeld)
Pumpe, IPC-N24, ISM 759	Ismatec (Wertheim-Mondfeld)
Pumpe, 4-Kanal	Ismatec (Wertheim-Mondfeld)
Pumpe, Vario	Ismatec (Wertheim-Mondfeld)
Sauerstoffmeßgerät MOPS-4	Comte (Hannover)

Spülmaschine Mielabor G 7783	Miele (Gütersloh)
Sterile Werkbank	Heraeus (Hannover-Hamburg)
Ultrahochgeschwindigkeitszentrifuge, Avanti TM Y-25	Beckmann (München)
Umwälzthermostat ecoline 011	Lauda Dr. R. Wobser (Lauda-Königshofen)
Umwälzthermostat RM6	Lauda Dr. R. Wobser (Lauda-Königshofen)
Wasserbad GFL 1083	Omnilab (Bremen)
Wasserstrahlpumpe	Glasbläserei der MHH
Zellisoliationsanlage	Werkstatt der MHH
Zentrifuge Rotina 46R	Hettich (Tuttligen)

Material:

Araldit Rapid, Art. Nr. 3131.1	Roth (Karlsruhe)
Dialyseschlauch Spectra/Pors Membrane, MWCO 6000-8000 Cat. No. 132 655	Spectrum Medical Industries (Los Angeles, CA, USA)
Flachbodengläser AR Glas, 50 x 10 mm, Cat. No. 0425	Roth (Karlsruhe)
Glasflaschen, diverse Größen	Schott (Mainz)
Glasflaschen, diverse Größen, mit Extrazugängen	Schott (Mainz), Glasbläserei der MHH
Glasküvetten Suprasil, Cat. No. 104B-QS	Hellma (Müllheim)
Kabelbinder, Art. Nr. 238045	Eltropa (Lohne)
Konnektor, Cat. No. 974.10	Vygon (Aachen)
LiChrospher 100RP-18e, 5 µm	Macherey-Nagel (Düren)
Luer-Lock-Schlauchverbinder Ø 1,6 mm, ♂, Cat. No. 2-1880 Ø 1,6 mm, ♀, Cat. No. 2-1886 Ø 2,4 mm, ♂, Cat. No. 2-1881 Ø 2,4 mm, ♀, Cat. No. 2-1887 Ø 3,3 mm, ♂, Cat. No. 2-1882 Ø 3,2 mm, ♀, Cat. No. 2-1888	Neolab (Heidelberg)
Minifilter Minisart RC4, Porengröße 0,2 µm, Art. Nr. 17821	Sartorius (Göttingen)
Multi-Well-Plate Washer, Nunc-Immuno Wash 12	Nunc (Wiesbaden)
Nahtmaterial, Cat. No. V310H	Ethicon (Norderstedt)

Nylongaze, Porengröße 100 µm, Cat. No. NYHD 100	Jürgens (Hannover)
Pipettenspitzen, diverse Größen	Eppendorf (Hamburg)
PUR System 725 Cat. No. 55679	Rohm und Haas (Bremen)
Röhrchen, 50 ml, Falcon, Cat. No. 352070	Becton Dickinson (Franklin Lake, N. J., USA)
Röhrchen, 15 ml, Falcon, Cat. No. 352097	Becton Dickinson (Franklin Lake, N. J., USA)
Schlauchklemmen, Art. Nr. H 13353	Novodirekt (Kehl)
Silikonkleber Elastosil E43, transparent, Cat. No.	Wacker Chemie (München)
Silikonschlauch, verschiedenen Größen	Gummi-Wöhleke (Hildesheim)
Spritzen, verschiedene Größen	B. Braun (Melsungen)
Schnellschlusskupplungen	Stäubli (Bayreuth)
Sterilfilter, Midisart 2000, 0,2 µm PTFE, Cat. No. 17 805	Sartorius (Göttingen)
Sterilfilter Reszist 50/0.2, 0,2 µm PTFE, Art.Nr. BN1192-1	Schleicher & Schüll (Dassel)
Sterilfilter Zap-Cup, Art. Nr. AZ 0038-1	Schleicher & Schüll (Dassel)
Übergangsstück, gerade, Cat. No. 2-0961	Neolab (Heidelberg)
Universal-Verschlußstopfen, Luer-Lock, Art.Nr. 9888	Vygon (Aachen)
Y-Stück, Ø 2,4 mm, Cat. No. 2-0957	Neolab (Heidelberg)
Zählkammer, Neubauer, Cat. No. 9 161 078	Omnilab (Bremen)
Zellkulturflaschen, 75 cm ² , mit Filter, Cat. No. 658175	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturschale, 60 x 15 mm, Cat. No. 3004	Becton Dickinson (Franklin Lake, N. J., USA)
96 well Platten, Flachboden, Cat. No. 655 101	Greiner (Frickenhausen)
96 well Platten, MaxiSorb, Cat. No. 442 404	Nunc (Wiesbaden)

Chemikalien:

Acetonitril	Cat. No. 100003	Merck (Darmstadt)
Ascorbinsäure	A-4544	Sigma (Steinheim)
Albumin (human)	Cat. No. 55912	Cappel (Eschwege)
Albumin (Schwein)	A-4414	Sigma (Steinheim)
Ammoniumacetat	Cat. No. 1.01116	Merck (Darmstadt)

Antikörper, Albumin	Cat. No. 55235	Cappel (Eschwege)
goat anti human		
Antikörper, Albumin,		Bethyl Laboratories
goat anti pig	Cat. No. 800-338-9579	(Montgomery, TX, USA)
Bicinchoninic Acid Kit, BCA-1		Sigma (Steinheim)
BSA	Fraktion V, A-1918	Sigma (Steinheim)
Cacodylsäure	Cat. No. 20840	Fluka (Buchs, Schweiz)
CaCl ₂	Cat. No. 949	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Cat. No. 15,182-3	Aldrich (Taufkirchen)
Collagenase	Typ IV CLS, Cat. No. CIV-22	Biochrom (Berlin)
Cytotoxicity Detection		Roche (Mannheim)
Kit (LDH)	Cat. No. 1 644 793	
Diazepam	D-0899	Sigma (Steinheim)
Dicumarol	M-1390	Sigma (Steinheim)
Dulbecco's MEM	F-0435	Biochrom (Berlin)
DMEM (10x)	Cat. No. 1-25P32-M	CellConcepts (Umkirch)
DMSO	Cat. No. 1.02952	Merck (Darmstadt)
Ethoxycoumarin	E-1379	Sigma (Steinheim)
EGTA	E-4378	Sigma (Steinheim)
Ethoxyresorufin	E-3763	Sigma (Steinheim)
Essigsäure	99-100 %, Cat. No. 6003	J.T. Baker (Deventer, Holland)
FCS	Cat. No. S0215	Biochrom (Berlin)
Glukagon	Cat. No. 8-9402-81-202-1	Novo Nordisk Pharma (Mainz)
Glukose	G-0251	Sigma (Steinheim)
Glukose-Standard	635-100	Sigma (Steinheim)
Glukose (Trinder)	Methode-Nr. 315	Sigma (Steinheim)
Glutardialdehyd	Cat. No. 4239	Merck (Darmstadt)
Glycin	Cat. No. 1504	J.T. Baker (Deventer, Holland)
Harnstoff-N	Methode-Nr. 640	Sigma (Steinheim)
HBSS (10x)	Cat. No. H15-012	PAA (Linz, Österreich)
HCl, 25%	1.00732.1000	Merck (Darmstadt)

HEPES	H-3375	Sigma (Steinheim)
H ₂ O ₂	Cat. No. 1.077209.250	Merck (Darmstadt)
HPLC-Wasser	Cat. No. 4218	J.T. Baker (Deventer, Holland)
H ₂ SO ₄	Cat. No. 0731	Merck (Darmstadt)
HybridoMed DIF 1000	Cat. No. FZ8055	Biochrom (Berlin)
Insulin	Zul.-Nr. 2932.00.00	Hoechst Marion Roussel (Frankfurt am Main)
Isopropanol	Cat. No. 8119	J.T. Baker (Deventer, Holland)
KCl	Cat. No. 9022528	Merck (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄	Cat. No. 4873	Merck (Darmstadt)
Laktat	Methode-Nr. 735	Sigma (Steinheim)
Laktat-Standard	735-11	Sigma (Steinheim)
LDH-Standard	Cat. No. 107 077	Roche (Mannheim)
Methanol	Cat. No. 8045	J.T. Baker (Deventer, Holland)
Midazolam	M-2419	Sigma (Steinheim)
4-Methylumbelliferon	M-1381	Sigma (Steinheim)
Methylumbelliferon-7- Glucuronid	M-5664	Sigma (Steinheim)
Methylumbelliferon-7- Sulfat	M-7133	Sigma (Steinheim)
NaCl	S-5886	Sigma (Steinheim)
Na ₂ CO ₃	Cat. No. 6392	Merck (Darmstadt)
NaHCO ₃	Cat. No. 6329	Merck (Darmstadt)
Na ₂ HPO ₄	Cat. No. 6580	Merck (Darmstadt)
NaOH	Cat. No. 1.06495	Merck (Darmstadt)
Nordiazepam	D-7282	Sigma (Steinheim)
Oxazepam	O-5254	Sigma (Steinheim)
Penicillin/Streptomycin /Glutamin	Cat. No. P-11-013	PAA (Linz, Österreich)
Prednisolon-21-Hydrogensuccinat, Solu Decortin	Zul.-Nr. 9238.00.00	Merck (Darmstadt)

Pyronin G	Cat. No. 107518	Merck (Darmstadt)
Resorufin	R-3257	Sigma (Steinheim)
Ringer-Puffer	PZN-4671719	Delta Pharma (Pfullingen)
Temazepam	T-8275	Sigma (Steinheim)
Tetramethylbenzidin	T-2885	Sigma (Steinheim)
Trimethylamin	T-0886	Sigma (Steinheim)
Trypanblau	Cat. No. S11-004	PAA (Linz, Österreich)
Trypsin	Cat. No. 35400-027	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
Tween 20	Art. Nr. 9127.2	Roth (Karlsruhe)
Umbelliferon	U-7626	Sigma (Steinheim)
William's Medium E	Cat. No. BESP112F	BioWhitaker (Verviers, Belgien)
Zitronensäure- Monohydrat	Cat. No. 33114	Riedel-de Haën (Seelze)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Inka Jasmund

Geboren am 28. Dezember 1973 in Hamburg

Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1980 – 1984	Grundschule in Nusse
1984 – 1993	Lauenburgische Gelehrtenschule Ratzeburg; Abschluss: Abitur

Studium

1993 – 1998	Studium „Biotechnologie“ an der Fachhochschule Hamburg; Abschluss: Diplom
07/93 – 12/93	Grundpraktikum bei der Firma Diestel GmbH
01/94 – 03/94	Grundpraktikum an dem Institut für Molekularbiologie (Medizinische Hochschule Lübeck)
04/97 – 09/97	Hauptpraktikum an dem GKSS Forschungszentrum
10/97 – 11/97	Aushilfstätigkeit in der Zellfermentation bei Boehringer Mannheim
01/98 – 07/98	Diplomarbeit bei Boehringer Mannheim
08/98 – 11/98	Aushilfstätigkeit in der Zellfermentation bei Boehringer Mannheim
12/98 – 09/02	Beschäftigung als Doktorandin an der Medizinischen Hochschule Hannover
10/99 – 03/02	Zusatzstudium für die Zulassung zur Promotion an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
07/01 – 10/01	Forschungsarbeiten an der Strathclyde University, Glasgow